

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. A. Storch

Einfluss der chronischen Tiefen Hirnstimulation auf die neuronale Plastizität im 6-OHDA Hemiparkinsonmodell der Ratte

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Manuel Ricken

aus Karlsruhe, geb. 24.06.1991

Rostock, 05.09.2019 (eingereicht)

Verteidigt am 04.02.2020



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine
Bearbeitungen 4.0 International Lizenz.

Selbstständigkeitserklärung

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
2. Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 05.09.2019

Manuel Ricken

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. A. Storch,
Klinik und Poliklinik für Neurologie,
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. A. Wree
Institut für Anatomie
Universität Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Stefan Liebau
Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie
Universität Tübingen

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung	1
1.1 Das idiopathische Parkinsonsyndrom	1
1.1.1 Geschichte und Klinik	1
1.1.2 Pathogenese	3
1.2 Tiefe Hirnstimulation	5
1.2.1 Entwicklung und Geschichte	5
1.2.2 Zielregion subthalamischer Nucleus	6
1.2.3 Neurophysiologie der THS	8
1.2.4 Klinische Effekte und Nebenwirkungen	9
1.3 Parkinsonmodelle der Ratte	11
1.4 Ziel der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Materialien und Chemikalien	15
2.2 Tiere	15
2.3 Tiermodell und Tiefe Hirnstimulation	15
2.4 Versuchsablauf	17
2.5 Verhaltenstests	18
2.5.1 Open-Field-Test	18
2.5.2 Stepping-Test	19
2.6 Kryostatschnitte	20
2.7 Immunhistochemie	23
2.7.1 Tyrosinhydroxylase Färbung	23
2.8 Stereologie	27
2.9 Gruppen	30
2.10 Ausgezählte Regionen	31
2.10.1 Substantia nigra pars compacta	32
2.10.2 Area tegmentalis ventralis	33
2.10.3 Locus coeruleus	33
2.11 Statistik	33
3 Ergebnisse	35
3.1 Substantia nigra pars compacta	35
3.1.1 Läsionskontrolle	35
3.1.2 Stimulationskontrolle	37
3.1.3 Beobachtungszeitraum 3 Wochen	38
3.1.4 Beobachtungszeitraum 6 Wochen	39

3.2	Area tegmentalis ventralis	41
3.2.1	Läsionskontrolle	41
3.2.2	Stimulationskontrolle	43
3.2.3	Beobachtungszeitraum 3 Wochen	44
3.2.4	Beobachtungszeitraum 6 Wochen	46
3.3	Locus coeruleus	48
3.4	Verhaltenstests	50
3.4.1	Stepping-Test	51
3.4.2	Open-Field-Test	53
3.5	Korrelation der Histologie mit den Verhaltenstests	54
3.5.1	Vergleich ST mit Zelldichte in der VTA	55
3.5.2	Vergleich OFT mit Zelldichte in der VTA	56
3.5.3	Vergleich ST mit Zelldichte in SNpc	57
3.5.4	Vergleich OFT mit Zelldichte in SNpc	58
3.6	Kovarianzanalysen	59
3.6.1	Einfluss 6-wöchige THS auf den ST	60
3.6.2	Einfluss 6-wöchige THS auf den OFT	61
4	Diskussion	64
4.1	Effektivität des Tiermodells	65
4.2	Einfluss der THS auf die neuronale Plastizität in der SNpc	65
4.3	Einfluss der THS auf die Motorik	67
4.4	Einfluss der THS auf die neuronale Plastizität im LC	68
4.5	Einfluss der THS auf die neuronale Plastizität in der VTA	69
4.6	Einfluss der Zelldichte auf das Angstverhalten	70
4.7	Ausblick	73
5	Thesen	75
6	Danksagung	76
7	Literatur	77
	Anhang A: Materialien	X
	Anhang B: Versuchsablauf	XI
	Anhang C: Protokoll Anfertigung von Kryostatschnitten	XII
	Anhang D: Protokoll TH-Färbung	XIV

Abkürzungsverzeichnis

6 – OHDA	6-Hydroxydopamin
AK	Antikörper
CPu	Caudate Putamen (oder Striatum)
DAB	Diaminobenzidin
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GP	Globus pallidus
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
LC	Locus coeruleus
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Levo dopa)
MVB	Mediales Vorderhirnbündel
SN	Substantia nigra
SNc/SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNr/SNpr	Substantia nigra pars reticularis
STN	Nucleus subthalamicus
THS	Tiefe Hirnstimulation
TH	Tyrosinhydroxylase
VTA	Area tegmentalis ventralis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Braak Stadien des IPS	4
Abbildung 2: Anatomie des STN	7
Abbildung 3: Elektrode im STN	16
Abbildung 4: Instrumentierung der Ratte.....	17
Abbildung 5: Versuchsablauf	18
Abbildung 6: Open-Field-Test	20
Abbildung 7: Stepping-Test.....	21
Abbildung 8: Rattenhirn im Kryostaten	22
Abbildung 9: Stoffwechsel der Katecholamine.....	24
Abbildung 10: Arbeitsaufbau Stereologie.....	27
Abbildung 11: Optical dissector und counting frame	29
Abbildung 12: Verteilung der optical dissectors über die ROI.....	30
Abbildung 13: Schnittserie VTA/SNpc.....	32
Abbildung 14: 30µm Hirnstammschnitt mit Locus coeruleus.....	34
Abbildung 15: Substantia nigra einer unilateral 6-OHDA läsierten Ratte	36
Abbildung 16: Läsionskontrolle Substantia nigra pars compacta.....	37
Abbildung 17: Stimulationskontrolle Substantia nigra pars compacta.....	38
Abbildung 18: Zelldichte in der Substantia nigra pars compacta nach 3-wöchiger Stimulation.....	39
Abbildung 19: Zelldichte Substantia nigra pars compacta nach 6-wöchiger Stimulation	40
Abbildung 20: Area tegmentalis ventralis einer unilateral 6-OHDA läsierten Ratte ...	41
Abbildung 21: Läsionskontrolle Area tegmentalis ventralis	42
Abbildung 22: Stimulationskontrolle Area tegmentalis ventralis	43
Abbildung 23: Zelldichte Area tegmentalis ventralis nach 3-wöchiger Stimulation.....	44
Abbildung 24: Hirnschnitte nach 6-wöchiger Stimulation	45
Abbildung 25: Zelldichte Area tegmentalis ventralis nach 6-wöchiger Stimulation.....	46
Abbildung 26: Locus coeruleus einer unilateral 6-OHDA läsierten Ratte	47
Abbildung 27: Zelldichte Locus coeruleus nach 6-wöchiger Stimulation	48
Abbildung 28: Initiationszeit im Stepping-Test nach 3 Wochen Stimulation	49
Abbildung 29: Initiationszeit im Stepping-Test nach 6 Wochen Stimulation	50
Abbildung 30: Zurückgelegte Wegstrecke im Open-Field-Test nach 3 Wochen Stimulation	51
Abbildung 31: Zurückgelegte Wegstrecke im Open-Field-Test nach 6 Wochen Stimulation	52

Abbildung 32: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Area tegmentalis ventralis nach 3 Wochen Stimulation mit der Initiationszeit im Stepping-Test	53
Abbildung 33: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Area tegmentalis ventralis nach 6 Wochen Stimulation mit der Initiationszeit im Stepping-Test	54
Abbildung 34: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Area tegmentalis ventralis nach 3 Wochen Stimulation mit der Wegstrecke im Open-Field-Test	55
Abbildung 35: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Area tegmentalis ventralis nach 6 Wochen Stimulation mit der Wegstrecke im Open-Field-Test	56
Abbildung 36: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Substantia nigra pars compacta nach 3 Wochen Stimulation mit der Initiationszeit im Stepping-Test	57
Abbildung 37: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Substantia nigra pars compacta nach 6 Wochen Stimulation mit der Initiationszeit im Stepping-Test	58
Abbildung 38: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Substantia nigra pars compacta nach 3 Wochen Stimulation mit der Wegstrecke im Open-Field-Test.....	59
Abbildung 39: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Substantia nigra pars compacta nach 6 Wochen Stimulation mit der Wegstrecke im Open-Field-Test.....	60
Abbildung 40: Einfluss der 6-wöchigen THS auf die Initiationszeit im Stepping-Test	61
Abbildung 41: Einfluss der 6-wöchigen THS auf die Wegstrecke im Open-Field-Test.....	62
Abbildung 42: Einfluss der 6-wöchigen THS auf die Wegstrecke im Open-Field-Test korrigiert für die Zelldichte in der ipsilateralen Area tegmentalis ventralis.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppenbezeichnungen	31
---------------------------------------	----

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Tiefen Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* (STN-THS) auf das Verhalten und die zelluläre Plastizität dopaminerger Strukturen von unilateral 6-OHDA läsierten Hemiparkinsonratten untersucht. Eine Besonderheit bestand im innovativen Versuchsdesigns mit chronischer Instrumentierung, welche es ermöglicht, Untersuchungen an frei beweglichen Ratten über lange Zeiträume von bis zu sechs Wochen durchzuführen.

Der Fokus lag dabei insbesondere auf möglichen neurorestaurativen Effekten der THS auf dopaminerge/katecholaminerge Tyrosinhydroxylase (TH)⁺ Nervenzellen. Außerdem wurden im Bereich des Verhaltens die nicht-motorischen, insbesondere psychiatrischen Nebeneffekte der THS analysiert.

Bei Patienten, die einer STN-THS unterzogen werden finden sich häufig unerwünschte psychiatrische Nebeneffekte wie Angststörungen oder Depression. Die Gründe hierfür werden auch nach über 30 Jahren Erfahrung mit dieser Therapie noch kontrovers diskutiert, sodass tierexperimentelle Studien zur Untersuchung der zugrundeliegenden Effekte notwendig sind. Außerdem ist es weiterhin unklar, ob es sich bei der THS um eine rein symptomatische Therapie handelt oder ob es neuroprotektive bzw. krankheitsmodifizierende Effekte gibt. Daher ist die wissenschaftliche Aufarbeitung dieser Fragen für die Zukunft der THS-Therapie von entscheidender Bedeutung.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die STN-THS in der Lage ist, die Motorik der Tiere im Stepping-Test nach drei Wochen Stimulation zu verbessern, wobei der Effekt nach sechs Wochen durch einen noch unbekannten Faktor neutralisiert wurde, welcher von der Dichte TH⁺ Zellen in den ausgezählten Regionen SNpc und VTA unabhängig war.

Weiterhin konnte kein Einfluss der Stimulation auf die Zelldichte in der SNpc gefunden werden. Im Gegensatz dazu fand sich eine mögliche neurorestaurative Wirkung im Sinne einer erhöhten Zelldichte TH⁺ Neurone in der *Area tegmentalis ventralis* sowohl nach 3- als auch nach 6-wöchiger STN-THS.

Es konnte außerdem ein durch STN-THS induziertes Ängstlichkeitsverhalten bestätigt werden. Dieses wurde mit Hilfe des Open-Field-Tests gemessen und fand sich

nach 3-wöchiger Stimulation sowie unter Berücksichtigung der erhöhten Zelldichte in der VTA als Kovariate auch nach 6-wöchiger Stimulation. Die Korrektur für die VTA-Zelldichte war notwendig, da eine erhöhte Zellzahl in der VTA nach 6 Wochen Stimulation mit einem größeren Ängstlichkeitsverhalten korreliert und folglich die abhängige Variable Angst beeinflusst.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine neurorestaurative Wirkung durch die THS möglich ist und dass diese das Angstverhalten der Tiere positiv beeinflussen kann. Andererseits führt die THS *per se* zu einem gesteigerten Angstverhalten, welches durch die beschriebene neurorestaurative Wirkung auf die VTA nach 6 Wochen kompensiert werden kann. Das Symptom Angst als THS Nebenwirkung muss folglich durch von der VTA unabhängige Hirnregionen vermittelt werden. Hierbei finden sich mehrere mögliche Zielstrukturen in enger Nachbarschaft zum STN, welche ungewollt mitstimuliert worden sein könnten. Diese Beobachtungen lassen sich gut mit der kontroversen Studienlage zum Thema psychiatrische Nebenwirkungen der STN-THS beim Menschen in Einklang bringen und zeigen ein Modell auf, wie diese durch verschiedene Mechanismen vermutlich in starker Abhängigkeit von der Mikrolage der Elektrode zustande kommen.

1 Einleitung

1.1 Das idiopathische Parkinsonsyndrom

1.1.1 Geschichte und Klinik

Als erster beschrieb 1817 der englische Arzt James L. Parkinson in seinem "Essay on the Shaking Palsy" sechs Patienten mit der Symptomtrias Rigor, Tremor und Akinese. Der französische Neurologe Jean-Marie Charcot benannte die Krankheit 1884 nach James Parkinson. Heute wird sie meist als idiopathisches Parkinsonsyndrom (IPS) bezeichnet. Erst 1912 gelang der Versuch einer zytopathologischen Charakterisierung durch F.H. Lewy der die nach ihm benannten „Lewy-Bodies“ als zytoplasmatische Einschlüsse erkannte (2). Die Prävalenz des IPS beträgt weltweit 1,8% bei Menschen über 65 Jahren und bis zu 2,6% für diejenigen über dem 85 Lebensjahr. Manifest wird die Erkrankung am häufigsten zwischen dem 50.-60. Lebensjahr. Alter ist somit einer der größten Risikofaktoren des IPS (3). Außerdem wird anhand der Prävalenzen die ökonomische Belastung der Gesellschaft durch die Erkrankung deutlich, insbesondere auch vor dem Hintergrund des demographischen Wandels in einer immer älter werdenden Bevölkerung. Obwohl genetische und juvenile Formen des IPS beschrieben sind, ist die Mehrheit der Fälle sporadisch, wahrscheinlich als Kombination aus einem komplexen Gen-Gen und Gen-Umwelt Zusammenspiel. Umweltfaktoren schließen Pestizide, Metalle, Kopfverletzungen, Lebensstile und Ernährungsgewohnheiten mit ein (4). Eine protektive Wirkung ist u.a. für Rauchen, Kaffee- und Teekonsum beschrieben (5). Genetische Formen der Parkinsonsyndrome haben ihre Ursache u.a. in bestimmten PARK-Genen, die insgesamt weniger als 10% der Erkrankungen ausmachen, wobei diese auch bei der Pathogenese der sporadischen Form einen gewissen Anteil haben (6).

Das IPS ist charakterisiert durch die Kardinalsymptome Rigor, Tremor, Akinese und Posturale Instabilität kombiniert mit einem guten Ansprechen auf die Therapie mit Levodopa. Charakteristisch ist hierbei außerdem eine deutliche Asymmetrie der motorischen Symptome bezüglich einer Körperhälfte.

Doch die alleinige Nennung motorischer Symptome des IPS wird der Erkrankung nicht gerecht, denn es gibt ebenso eine Vielzahl nicht-motorischer Symptome, welche teilweise lange vor dem ersten Auftreten motorischer Symptome nachweisbar sind. Dazu

zählen u.a. die Hyposmie, Obstipation, Zykllothymie bis hin zur manifesten Depression, Schmerzen, Tagesmüdigkeit, REM-Schlaf-Verhaltensstörung oder exzessive Träume. Aber auch Gedächtnisprobleme, so haben 22% der Patienten schon bei Diagnosestellung einen pathologischen MOCA Test (7). Weiter Symptome sind Drangurie, Angst oder sexuelle Dysfunktionen. Einzelne dieser nicht-motorischen Symptome bzw. bestimmte Kombinationen aus ihnen erlauben sogar ein „wahrscheinliches Parkinsonsyndrom“ vor dem Auftreten von motorischen Symptomen zu diagnostizieren. Die größte Schwierigkeit im klinischen Alltag besteht diesbezüglich darin, geeignete Tests zur Erfassung von nicht-motorischen Symptomen zu finden (8). Besonders die REM-Schlaf-Verhaltensstörung (RBD) hat eine außergewöhnlich hohe Korrelation mit dem späteren Auftreten von neurodegenerativen Erkrankungen. Etwa 81% der Patienten mit RBD entwickeln im Mittel etwa 14 Jahre nach Diagnosestellung ein Parkinson- oder demenzielles Syndrom (9). Der klinische Phänotyp des Parkinsonsyndroms und dabei insbesondere der der nicht-motorischen Symptome ist sehr heterogen. Dies könnte mit den in unterschiedlichem Maße betroffenen Neurotransmittersystemen zusammenhängen. Dabei ist nicht nur das dopaminerge, sondern auch das cholinerge, noradrenerge und serotonerge System betroffen. Jedem dieser Systeme lassen sich wiederum unterschiedliche motorische und nicht-motorische Symptome des Parkinsonsyndroms zuordnen. Mittlerweile gilt es daher als etabliert, dass das IPS eher als Multineurotransmitter und sogar Multiorganerkrankung anzusehen ist. So wurden α -Synuclein Ansammlungen in Darm, Pankreas, Herz, Speicheldrüsen und Haut gefunden (10). Daher sollte eher von Parkinson als Syndrom und nicht als Erkrankung gesprochen werden (11). Die Einteilung der verschiedenen Phänotypen des IPS anhand der unterschiedlichen Ausprägung von nicht-motorischen Symptomen und deren Pathogenese je nach Ausprägung der Degeneration im zugehörigen Transmittersystem befindet sich zur Zeit im Wandel und wird in Zukunft vermutlich zu einer neuen Einteilung in verschiedene Subtypen führen (12).

1.1.2 Pathogenese

Ein wichtiger Schritt in Richtung eines Verständnisses der Pathogenese des IPS wurde durch Braak et al. geleistet, welche postulierten, dass sich die Erkrankung über das Gehirn in charakteristischer Weise ausbreitet (**Abbildung 1**). Dabei scheint die Pathologie zunächst von der Magenschleimhaut ausgehend über mesenteriale Plexus im Ncl. dorsalis nervi vagi zu beginnen und von dort durch den unteren Hirnstamm, den *Locus coeruleus*, die *Substantia nigra* und subkortikale Strukturen bis zum Neokortex voranzuschreiten. Diese Entwicklung findet sich in den 6 Braak Stadien wieder (13, 14). Mittlerweile wurden noch weitere mögliche Routen der Ausbreitung der Neurodegeneration postuliert, welche wiederum mit unterschiedlichen nicht-motorischen Symptomen einhergehen. Auf der einen Seite die klassische „Hirnstamm Route“, die wohl dominierend mit Schlafdysfunktion wie REM-Schlaf-Verhaltensstörung sowie dysautonomen Symptomen und eher nicht mit Hyposmie einhergeht. Auf der anderen Seite existiert eine olfaktorisch/limbische Route, welche früh mit Anosmie sowie Depression, Angst und Fatigue Symptomatik einhergeht. Und letztlich sogar ein neokortikaler Subtyp, welcher durch frühe kognitive, eher cholinerge Symptome charakterisiert ist (15). Es wird angenommen, dass es durch eine Kombination aus verschiedenen Faktoren im Sinne einer "multiple hit" Theorie zur Schädigung von dopaminergen Neuronen kommt (16). Starke Hinweise gibt es für Proteinefehlfaltung und proteasomale Dysfunktion, welche auf dem Boden einer erhöhten Empfindlichkeit des alternden Gehirns zu synaptischer Fehlverarbeitung und Neurotoxizität führen kann. Des Weiteren spielt eine mitochondriale Dysfunktion mit reduzierter Aktivität des Komplex-I der Atmungskette sowie damit verbundenem oxidativem Stress eine Rolle, welcher wiederum über den Mechanismus der Schädigung des 26S Proteasoms und konsekutiv verminderten Proteinabbaus wirksam sein könnte (18, 19). Weitere Theorien beinhalten Neuroinflammation und Neurotransmitterfehlfunktionen. Und sogar ein verändertes Darmmikrobiom, welches zu erhöhter Darmpermeabilität und damit Ausbreitung fehlgefalteter Proteinstrukturen über das vegetative Nervensystem zum Gehirn führen könnte wird postuliert (20, 21). Spezielle Proteinablagerungen, die α -Synucleine, spielen dabei eine besondere Rolle. α -Synuclein Ablagerungen in Form von Lewy-Körperchen werden als eosinophile zytoplasmatische

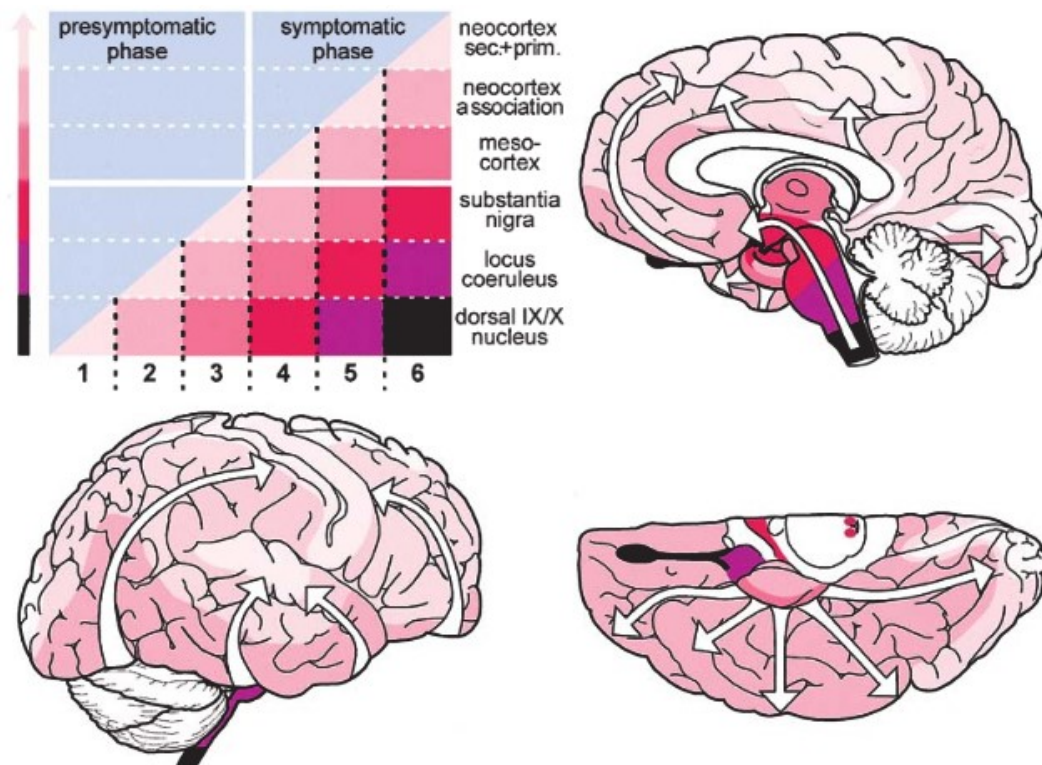


Abbildung 1: Braak Stadien des IPS

Dargestellt sind die 6 Braak Stadien des IPS. Die Pathologie beginnt früh im Bulbus olfactorius oder Ncl. dorsalis n. vagi und breitet sich von dort ausgehend zunächst auf weitere Hirnstammkerngebiete wie den *Locus coeruleus* oder die Ncll. raphes aus. Im nächsten Schritt ist die *Substantia nigra* betroffen, was zu den klassischen motorischen Symptomen und zum Übertritt von der präsymptomatischen in die symptomatische Phase führt. In Stadium 4 ist erstmalig der Kortex involviert, wobei zunächst mesokortikale Areale betroffen sind, gefolgt von neokortikalen Assoziationsarealen und im letzten Schritt dann sekundäre und primäre Kortexregionen. Quelle: Braak, Rüb et al (17).

Einschlusskörperchen in verschiedenen Regionen des Gehirns beim Parkinsonsyndrom gefunden. α -Synuclein scheint normalerweise eine Rolle für die Stabilisierung präsynaptischer Vesikel zu spielen (22). Genauer helfen Synucleine den SNARE - Komplex aufzubauen, eine wichtige Struktur in der Freisetzung präsynaptischer Vesikel und haben hier eine Chaperon-artige Funktion (23). Letztlich bleibt die exakte Funktion allerdings bisher noch unklar. Physiologischerweise kommt α -Synuclein als Protein mit überwiegend α -helikalen Anteilen vor. Wenn es zu viele β -Faltblatt Formationen enthält, neigt es zur

Aggregation. Das konnte man eindrücklich in einigen familiären Parkinsonformen zeigen (24). Dieses fehlgefaltete α -Synuclein vollführt ein prionenartiges Verhalten, indem es weitere α -helikale Synucleine aggregiert und sich sogar zwischen Nervenzellen ausbreitet und durch axonalen Transport in weitere Regionen transportiert wird. Aufgrund dieser Erkenntnisse kommt dem α -Synuclein eine entscheidende Rolle bei der möglichen Pathogenese des IPS zu. Insbesondere, da man α -Synuclein haltige Einschlüsse sowohl im Bulbus olfactorius als auch in vegetativen Plexus des Verdauungssystems nachweisen konnte. Eine Ausbreitung der Proteine über diesen Weg wäre also denkbar (25).

1.2 Tiefe Hirnstimulation

Zur Therapie des IPS standen bisher vorwiegend medikamentös-symptomatische Ansätze im Vordergrund. Insbesondere die Therapie mit L-Dopa in Kombination mit einem Decarboxylase Hemmer oder alternativ Dopaminrezeptoragonisten gelten als Therapiestandard. Weitere im Einsatz befindliche Substanzen sind COMT (Catechol-O-Methyltransferase)-Inhibitoren, MAO-B (Monoaminoxidase B)-Hemmer sowie NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Antagonisten. Nach der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie zum IPS sollte Patienten mit entweder medikamentös nicht behandelbaren motorischen Fluktuationen und Dyskinesien oder einem medikamentös nicht kontrollierbaren Tremor eine THS Therapie angeboten werden. Außerdem sollten deren Symptome auf Levodopa ansprechen (>33% Verbesserung im UPDRS III), es sollte kein demenzielles Syndrom oder eine andere signifikante psychische oder somatische Komorbidität bestehen sowie keine neurochirurgischen Kontraindikationen vorhanden sein.

1.2.1 Entwicklung und Geschichte

Neurochirurgische Verfahren zur Behandlung von Bewegungsstörungen waren bereits seit Mitte des 20. Jahrhunderts bekannt und wurden von Pionieren wie Irving Cooper etabliert. Erst 1987 fiel Benabid und Kollegen während einer operativen Thalamotomie zufällig auf, dass eine hochfrequente elektrische Stimulation des VIM thalami ebenfalls in der Lage war, den Tremor des Patienten zu unterdrücken. Dies war die Geburtsstunde

der Tiefen Hirnstimulation (26, 27). Zunächst wurden vorwiegend die Regionen VIM und GPi verwendet. Der STN geriet erstmals in den Fokus der Therapie von Bewegungsstörungen, als Bergman und Aziz in den 1990er Jahren im MPTP Primatenmodell zeigen konnten, dass die Läsion des STN in der Lage war, die Symptome Rigor und Bradykinese zu verbessern (28, 29). Kurz darauf wurde die erste THS des STN 1993 in Grenoble durchgeführt (30). Die Stimulation des STN erwies sich in den Folgejahren als effektiv in der Linderung von Parkinson-typischen Symptomen. Erstmals konnten auch Verbesserungen bei Rigor und Bradykinese erzielt werden. Bei den vorher stimulierten Zielgebieten VIM und GPi verbesserte sich lediglich der Tremor bzw. die Dyskinesien signifikant (31, 32). Inzwischen wurden weit mehr als 150.000 Patienten einer THS zugeführt und die Behandlung gilt als etabliert zur Verbesserung des klinischen Outcomes sowie der Lebensqualität und ist zudem kosteneffektiv auch in frühen Krankheitsstadien (33).

1.2.2 Zielregion subthalamischer Nucleus

Der STN ist eine bikonvexe Struktur, welche in ein Netz aus Faserstrukturen eingebettet ist, zu denen u.a. die *Capsula interna*, der *Fasciculus thalamicus* (*Ansa lenticularis* und *Fasciculus lenticularis*) sowie der *Lemniscus medialis* zählen. Letztere führen Fasern vom GPi zum Thalamus. Ventral an den STN angrenzend findet sich die *Substantia nigra*, posteromedial der *Ncl. ruber* sowie dorsal die *Zona incerta*, welche den STN vom ventralen Thalamus trennt (34). Diese anatomischen Zusammenhänge sind in **Abbildung 2** dargestellt.

Der dominierende Zelltyp des Kerngebietes sind glutamaterge Projektionsneurone und in etwa 7,5% GABAerge Interneurone (35, 36).

Der STN unterhält afferente und efferente Verbindungen zu verschiedenen Hirnregionen kortikal sowie subkortikal. Insbesondere erhält er GABAerge Afferenzen aus dem GPe und entlässt glutamaterge Efferenzen zum GPi, beides vorwiegend via *Fasciculus subthalamicus*. Weitere Verbindungen sind: Der hyperdirekte Weg via glutamaterge Afferenzen aus dem Kortex (primär motorischer Kortex, supplementär motorischer Kortex, prämotorischer Kortex, limbische Kortexareale und andere), Afferenzen von paraf

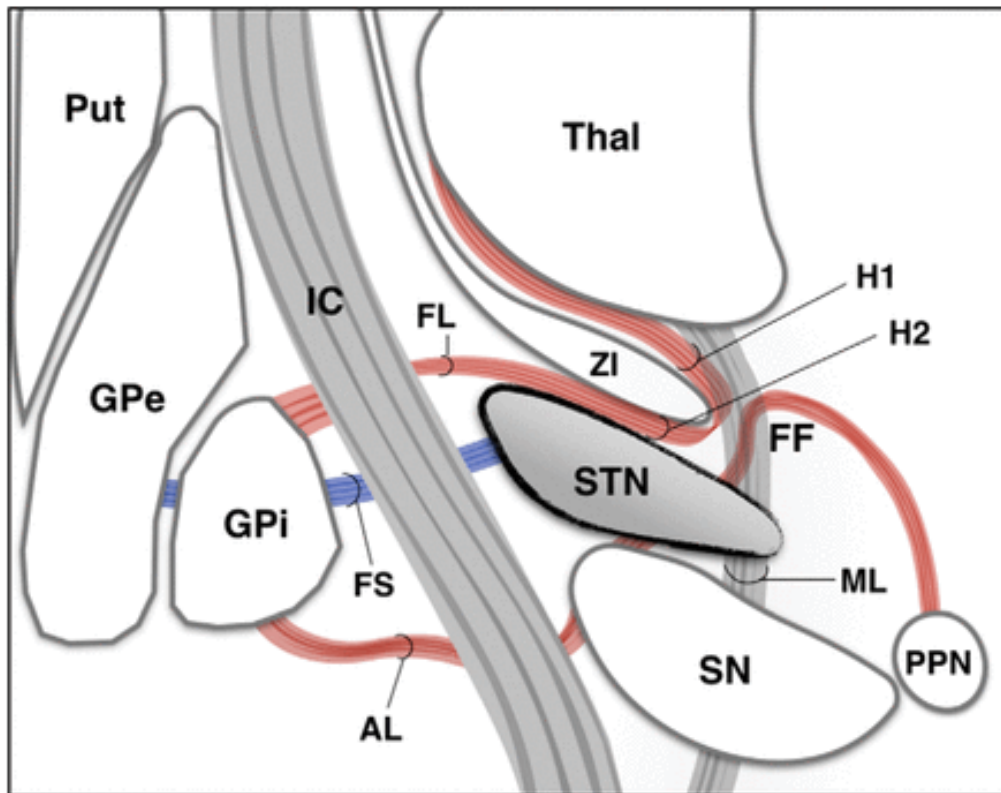


Abbildung 2: Anatomie des STN

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Anatomie des STN mit seinen benachbarten Strukturen (beim Menschen). Put, Putamen; Thal, Thalamus; IC, Capsula interna; GPe, Globus pallidus externus; GPi, Globus Pallidus internus; ZI, Zona incerta; STN, *Nucleus subthalamicus*; FL, *Fasciculus lenticularis*; FS, *Fasciculus subthalamicus*; AL, *Ansa lenticularis*; FF, *fields of Forel*; H1/H2, H1 bzw. H2-field of Forel; ML, *Lemniscus medialis*; SN, *Substantia nigra*; PPN, *Nucleus pedunculopontinus*. Quelle: Hamani, Florence et al. (46).

aszikulären und centromedianen Nuclei des Thalamus sowie multiple afferente und efferente Verbindungen in Hirnstammgebiete wie zur SNpc oder zum LC. Unter letztere fallen auch Verbindungen zur VTA (37–40).

Führt man diese Verbindungen zu einem funktionellen Konzept zusammen, so lässt sich der Nucleus in 3 unterschiedliche Bereiche unterteilen:

1. Den "limbischen STN", welcher eher medial-rostral liegt und Verbindungen zum limbischen Kortex, dem *Ncl. accumbens* und der VTA hat.
2. Den "Assoziativen STN", welcher ventral-lateral-rostral liegt und Verbindungen zu assoziativen Kortexarealen (bspw. präfrontaler Kortex) sowie dem GP und *Striatum* hat.
3. Den "motorischen STN", welcher in die klassische motorische Basalganglienschleife (s.o.) eingebunden ist (41).

1.2.3 Neurophysiologie der THS

Die hochfrequente Stimulation des STN resultiert in einem Großteil der Zellen zunächst in einer erhöhten Frequenz von Aktionspotenzialen, welche nach kurzer Zeit in einen Status der absoluten Hemmung im Sinne eines Depolarisationsblocks übergeht. Diese könnte vermittelt sein durch die Inaktivierung von Natriumkanälen subthalamischer Neurone (42). Außerdem zeigt sich ein erhöhter Kaliumstrom mit einem Anstieg des extrazellulären Kaliums durch THS, welches ebenfalls zu einem Depolarisationsblock führt (43). Ein weiterer postulierter Mechanismus ist die Exzitation präsynaptischer GABAerger Axonterminalen, welche wiederum die Neurone im Zielgebiet hemmen (44, 45). Weiterhin gibt es Hinweise, dass THS neben den erwähnten elektrophysiologischen Veränderungen auch zu neurobiologischen Effekten wie direkte Transmitterfreisetzung führt. Es konnte gezeigt werden, dass die THS des STN sowohl beim Affen als auch beim Menschen zu einer erhöhten Dopaminfreisetzung führt. Wobei bisher nicht ganz klar ist, welche Rolle diese Phänomene für die Wirksamkeit der THS spielen (47). Ein weiterer Mechanismus der THS, welcher eine Rolle zu spielen scheint, ist die Unterbrechung von pathologischen β -Oszillationen im Netzwerk der Basalganglien. Es gibt eine Tendenz von neuronalen Elementen innerhalb der Basalganglien, sich mit einer Frequenz um 20 Hz zu synchronisieren, wenn ein dopaminerger Input fehlt. Durch hochfrequente Stimulation >70 Hz können diese pathologischen Oszillationen durchbrochen werden (48).

Passend zu dieser Theorie führt die STN-Stimulation mit 20 Hz (β -Band) zur verstärkten Bradykinese (49). Ein relativ junges Modell zur Beschreibung der pathologischen Kreisläufe beim IPS postuliert, dass nicht nur die basalganglien-thalamo-kortikalen Schleifen, sondern auch die cerebello-thalamo-kortikalen Netzwerke an der Pathophysiologie des Ruhetremors beim IPS beteiligt sind. Hierbei wurde das "Dimmer-Schalter-Modell" propagiert, bei dem die pathologischen Oszillationen zwar im Bereich der Basalganglien beginnen (analog zu einem Lichtschalter), aber von diesem in das cerebello-thalamo-kortikale System gelangen und dort zirkulieren und für eine Aufrechterhaltung des Ruhetremors sorgen, bzw. seine Amplitude bestimmen (wie ein Lichtdimmer). Als hauptverantwortlichen Schalter wurde der GPi identifiziert, von welchem aus die pathologischen

Oszillationen über den Kortex in den Thalamus und damit in die cerebello-thalamo-kortikale Schleife gelangen. Interessant hierbei ist, dass es somit Überschneidungen mit der Pathophysiologie des essentiellen Tremors gibt, da auch bei diesem das cerebello-thalamo-kortikale Netzwerk pathologisch oszilliert und damit die Rolle des VIM als Stimulationsregion für beide Erkrankungen unterstrichen wird. Die Rolle des STN in diesem Kreislauf bleibt bisher offen. Da der STN im Gegensatz zum GPi in regem afferenten und efferenten Austausch mit dem Kortex steht und ebenfalls ein gutes Target für die THS zur Tremorbehandlung des IPS darstellt, ist es möglich, dass auch dieser Teil des pathologischen Netzwerkes ist (50, 51).

1.2.4 Klinische Effekte und Nebenwirkungen

STN-THS alleine kann den motorischen Score im UPDRS um 36% verbessern (52, 53). Außerdem ist es durch THS möglich die Antiparkinsonmedikation um 38% zu reduzieren (54, 55). Interessanterweise ermöglicht der Grad des Ansprechens auf L-DOPA präoperativ keine Vorhersage bezüglich des möglichen Ansprechens auf die THS. Dafür können sich Symptome, die vorher schlecht auf die dopaminerge Medikation angesprochen haben (insbesondere Tremor und Dyskinesien) durch die THS deutlich verbessern (56). Der Tremor verbessert sich nach Applikation der THS innerhalb von Sekunden (57). Dem gegenüber zeigt sich eine Besserung des Rigors und der Bradykinese nach dem Anschalten der THS erst nach etwa zwei Stunden und Veränderungen axialer Symptome wie Gangbild oder Posturale Instabilität sind erst Stunden bis Tage später nachweisbar. In gleicher Weise verhält es sich beim Abschalten einer vorher bestehenden THS. Diese Ergebnisse zeigen, dass es unterschiedliche Mechanismen geben muss nach welchen die THS auf die motorischen Symptome wirkt. Während die THS bei Symptomen, die schnell antworten auf die Stimulation möglicherweise eher über veränderte Netzwerkaktivität wirkt, könnten bei anderen Symptomen mit längeren Latenzzeiten Mechanismen wie synaptische Plastizität oder anatomisches Remodelling eine Rolle spielen (58–60).

Aktuell wird die THS eher in späteren Krankheitsstadien empfohlen (s.o.). In der *EARLIS-TIM* Studie konnte an 251 Patienten, welche im Mittel 52 Jahre alt waren und eine durchschnittliche Krankheitsdauer von 7,5 Jahren hatten gezeigt werden, dass die

THS auch in frühen Krankheitsstadien beim Auftreten der ersten medikamenteninduzierten motorischen Komplikationen effektiv ist. Die THS erwies sich hierbei gegenüber der medikamentösen Therapie überlegen im Bezug auf die Endpunkte Lebensqualität, Levodopa-induzierte motorische Komplikationen und Zeit mit guter Mobilität und ohne Dyskinesien. Diese Ergebnisse zeigen, dass es in Zukunft sinnvoll sein könnte, Patienten deutlich früher als aktuell einer THS-OP zuzuführen (61).

In der klinischen Praxis existiert nur eine limitierte Möglichkeit die Parameter der Stimulation zu verändern. Man kann die Pulsweite, die Frequenz eines Pulses sowie die Stromstärke einstellen. Die optimalen Parameter werden während der stereotaktischen Operation unter klinischer Kontrolle zusammen mit dem Patienten gefunden. Bewährt haben sich in der Praxis folgende Parameter: Stimulation monopolar, kathodisch, Impulsbreite: 60-90ms, Amplitude: 1-3,5V und Frequenz: 130Hz. Das Ziel ist es eine optimale Verbesserung der Symptome bei möglichst minimalen Nebeneffekten zu erhalten. Nebeneffekte entstehen bei höherer Stromstärke, aber insbesondere auch bei falscher Elektrodenposition. Liegt die Elektrode etwas zu weit in der Nähe der Capsula interna, kommt es zu tonischen Muskelkontraktionen und Dysarthrie. Bei Fehllage im ventralen Teil des STN kann es zu einer erhöhten Inzidenz von Manie, Angst und Depression kommen, was es auch in den Rattenmodellen aufgrund der besonders geringen Größe des Zielgebiets zu beachten gilt.

Die THS hat neben den operativen Komplikationen vielfältige vor allem psychiatrische Nebenwirkungen, über deren Auftreten und Attribution als direkte Nebenwirkungen der THS es allerdings Kontroversen in der Literatur gibt. Am häufigsten unter den psychiatrischen Nebenwirkungen nach THS treten depressive Zustände auf, aber auch Wahn, Euphorie und Angststörungen sind beschrieben (62, 63).

Einige Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass sich unter THS depressive Symptome sogar verbessern können (64–66), andere fanden hingegen keinerlei Veränderungen depressiver Symptomatik nach THS-OP (67–69) oder sogar das Auftreten von leichter (70, 71) bis schwerer depressiver Symptomatik bis hin zum Suizid (72).

Über das Symptom Angst gibt es analog zur Depression kontroverse Ergebnisse, einige Autoren sahen eine Verbesserung von Angst nach THS (73, 74) andere konnten keinen

Einfluss der finden (75). Andere berichten von postoperativ erstmaligem Auftreten von Angst. Auch die Zeitpunkte des Auftretens von psychiatrischen Nebeneffekten variieren stark, was vor allem am jeweils gewählten Studiendesign lag. Einige Nebeneffekte treten direkt während der Operation bei Fehlpositionierung der Elektrode auf. Aber auch eine Beobachtung der pathologischen Symptome erst Monate nach der Operation sind beschrieben (76). Dass eine diskrete Fehlplatzierung der Stimulationselektrode zu schwerwiegenden psychiatrischen Symptomen führen kann, berichten Bejjani und Mitarbeiter eindrücklich an einem Patienten, der intraoperativ nach einer Teststimulation 2,2mm medial des Zielgebietes ein aggressives Verhalten entwickelte (77). Okun und Mitarbeiter fanden, dass man Angst durch bestimmte Elektrodenpositionen induzieren kann (78). Weitere psychiatrische Nebenwirkungen der THS können sein: Hypersexualität (79), Euphorie (76), Manie (80), Psychosen (81), oder kognitive Verschlechterung bis hin zum demenziellen Syndrom (82, 83). Nicht-psychiatrische Nebenwirkungen der THS umfassen u.a. Gewichtszunahme (84), Dysarthrie, Parästhesien und Kopfschmerzen (85). Zusätzlich kommt es sehr auf die Stimulationsparameter oder die Ausbreitungsrichtung des Spannungsfeldes an, ob Nebeneffekte der THS auftreten. Beim Menschen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein mehr konzentrisch auf den hinteren Teil des STN gerichtetes Spannungsfeld weniger Nebenwirkungen hervorruft, als ein sich zirkulär ausbreitendes (86). Ein neuer THS Ansatz ist die sogenannte "closed-loop" THS, bei welcher die Stimulationselektrode nur dann aktiviert wird, wenn ein Empfänger in den entsprechenden kortikalen Regionen der Neuronenschleifen Aktivität registriert. (87) Dies zeigt beispielhaft, dass die optimale Konfiguration der THS noch nicht gefunden wurde und dass man in den nächsten Jahren auf diesem Gebiet noch deutliche Fortschritte erwarten darf.

1.3 Parkinsonmodelle der Ratte

Ein ideales Modell des Parkinsonsyndroms sollte beinhalten, dass das Tier bei Geburt über eine normale Zellzahl in der *Substantia nigra* verfügt, dann mehr als 50% der Zellen über einen möglichst kurzen Zeitraum verliert und gleichzeitig die motorischen Kardi-

nalsymptome der Krankheit ausbildet. Außerdem sollte es möglichst eine Lewy-Körperchen-ähnliche Pathologie aufweisen (88). Eines der am längsten etablierten Modelle des Parkinsonsyndroms wurde entwickelt, indem man das Toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) einsetzte. Die Wirkung dieses Giftes wurde 1982 entdeckt, als einige Drogensüchtige in Kalifornien nach der Injektion von mit MPTP verunreinigtem Heroin ein akutes Parkinsonsyndrom entwickelten (89). Sie beruht ebenfalls auf einer Blockade des Komplex-I der Atmungskette. Das hieraus entwickelte Tiermodell lässt sich an Mäusen und Primaten anwenden, nicht jedoch an Ratten, da diese im Vergleich zu Affen eine relativ geringe MPTP Suszeptibilität aufweisen. Die Tiere entwickeln alle klinischen motorischen Kardinalsymptome. MPTP zerstört dopaminerge Neurone in der SN und dem LC, wobei die Neurone der benachbarten VTA resistenter zu sein scheinen (90, 91). Ein anderer Ansatz besteht darin, bestimmte Pestizide als Toxine zu verwenden. Es ist bekannt, dass die vermehrte Exposition gegenüber Umweltgiften und Pestiziden beim Menschen zu einer erhöhten Inzidenz des Parkinsonsyndroms führt. Ein Pestizid, welches im Tiermodell als Auslöser genutzt werden kann ist Rotenon, ebenfalls ein spezifischer Komplex-I Inhibitor. Hierzu wird das Gift intravenös injiziert und führt zum progressiven Verlust nigrostriataler Neurone mit konsekutiver Entwicklung der motorischen Kardinalsymptome sowie an Lewy-Körperchen erinnernder zytoplasmatischer Einschlüsse. Diese Modelle unterstreichen damit außerdem die besondere Bedeutung des Komplex-I der Atmungskette in der Pathophysiologie des Parkinsonsyndroms. Da die intravenöse Injektion relativ selektiv zum Verlust dopaminerger Neurone führt, lässt sich hieraus schließen, dass diese Region besonders vulnerabel gegenüber Komplex-I Inhibition ist. Eine Limitation des Modells ist, dass die Empfindlichkeit der Ratten auf das Toxin extrem differiert (92). Ein weiteres interessantes Modell ist das von Feany und Bender entwickelte Modell der α -Synuclein Expression bei der Taufliege *Drosophila melanogaster*, welches mit einem altersabhängigen Verlust dopaminerger Neurone sowie motorischer Dysfunktion einhergeht (93). Nach ähnlichem Prinzip wurden inzwischen auch transgene α -Synuclein Mausmodelle entwickelt (94). Ein weiteres etabliertes Modell ist das 6-OHDA Modell, welches in verschiedenen Varianten durchführbar ist (95).

Die am häufigsten verwendeten sind die unilaterale Injektion in die *Substantia nigra* oder in das mediale Vorderhirnbündel. Eine weitere Variante ist es, das Toxin in das Striatum zu injizieren, wo es dann über retrograden Transport durch Axonterminalen von dopaminergen Projektionsneuronen der *Substantia nigra* aufgenommen wird. Je nach Variante kommt es zu einer unterschiedlichen Dynamik und Effektivität der Läsion. Die Toxizität von 6-OHDA beruht am ehesten auf einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Autooxidation und ist deshalb spezifisch für katecholaminerge Neurone, da es über dieselben Transportsysteme wie die monoaminergen Neurotransmitter in das Zytosol der Nervenzellen gelangt (96).

Die Variante 6-OHDA in das Striatum zu injizieren ist stark davon abhängig, wie häufig die Injektionen stattfinden und welche Menge an 6-OHDA verwendet wird. Injiziert man an 4 verschiedenen Stellen etwa je 7µg 6-OHDA resultiert das in einem Verlust von 80-95% der TH⁺ Faserdichte im Striatum sowie einer 75 prozentigen Reduktion der TH⁺ katecholaminergen bzw dopaminergen Neurone in der SN über einen Zeitraum von bis zu 16 Wochen (97, 98). Der Vorteil dieses Modells liegt in dem eher langsam fortschreitenden Zelluntergang, welcher außerdem geringer ausgeprägt ist als bei den anderen Modellen. Dieses Modell ist somit in der Lage eher frühere Krankheitsstadien zu simulieren (99, 100).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modell erfolgte eine Injektion in das mediale Vorderhirnbündel, hierbei kommt es je nach Literatur zu einem bis zu 99 prozentigem Abfall der Zellzahl TH⁺ dopaminergen Neurone in der SNpc und bis zu 76% in der VTA nach etwa 5 Wochen. Durch den vergleichsweise schnellen Zelltod in Verbindung mit einer hochgradigen Läsion entspricht dieses Modell eher den Endstadien des IPS (101).

Eine weitere Limitation der bisherigen Tiermodelle ist es, dass es noch kein Modell gibt, welches in der Lage ist auch die nicht-motorischen Symptome der Krankheit wie Riechstörungen, Obstipation, Depression oder kognitive Einschränkungen zu erzeugen. Daher ist es in der Zukunft erstrebenswert, ein Tiermodell zu finden, dem es gelingt die Pathophysiologie der Krankheit besser abzubilden.

1.4 Ziel der Arbeit

Obwohl die Tiefe Hirnstimulation des STN ein seit vielen Jahren etabliertes und sicheres Verfahren im Rahmen der Behandlung des IPS ist, gibt es weiterhin viele ungeklärte Fragen zu dieser Therapieoption. Kontrovers diskutiert werden u.a. die genauen Wirkmechanismen der elektrischen Stimulation von Hirngewebe. Außerdem ist es immernoch unklar, ob es sich bei der THS um eine rein symptomatische Therapie handelt, oder ob hierdurch neuroprotektive/neurorestaurative bzw. krankheitsmodifizierende Effekte ausgelöst werden können. Diese Zusammenhänge besser erklären zu können ist entscheidend für die Zukunft der modernen Parkinsontherapie, da eine THS aktuell erst im Endstadium der Erkrankung eingesetzt wird. Sollte sich herausstellen, dass der Krankheitsprogress durch Stimulation bestimmter Hirnregionen verlangsamt werden kann, müsste man zukünftig umdenken und die Therapie den Patienten bereits früher im Krankheitsverlauf anbieten. Daher war eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit, ob durch Hochfrequenzstimulation des STN solche neuroprotektiven/neurorestaurativen Effekte ausgelöst werden können.

Ein weiteres Problem der THS ist, dass sie mutmaßlich zu unerwünschten psychiatrischen Nebeneffekten wie Depression und Angststörungen führt. Diesbezüglich gibt es eine kontroverse Datenlage, wobei aktuell Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen von einer THS ausgeschlossen werden. Deshalb ist es wichtig, diese Effekte genauer zu untersuchen und zu verstehen, weshalb diese bei einigen Patienten auftreten, bei anderen jedoch nicht.

Eine zentrale Frage bestand daher darin, ob die auch im Rattenmodell auftretenden psychiatrischen Symptome unter THS im STN durch Veränderung auf zellulärer Ebene, insbesondere im dopaminergen System hervorgerufen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Chemikalien

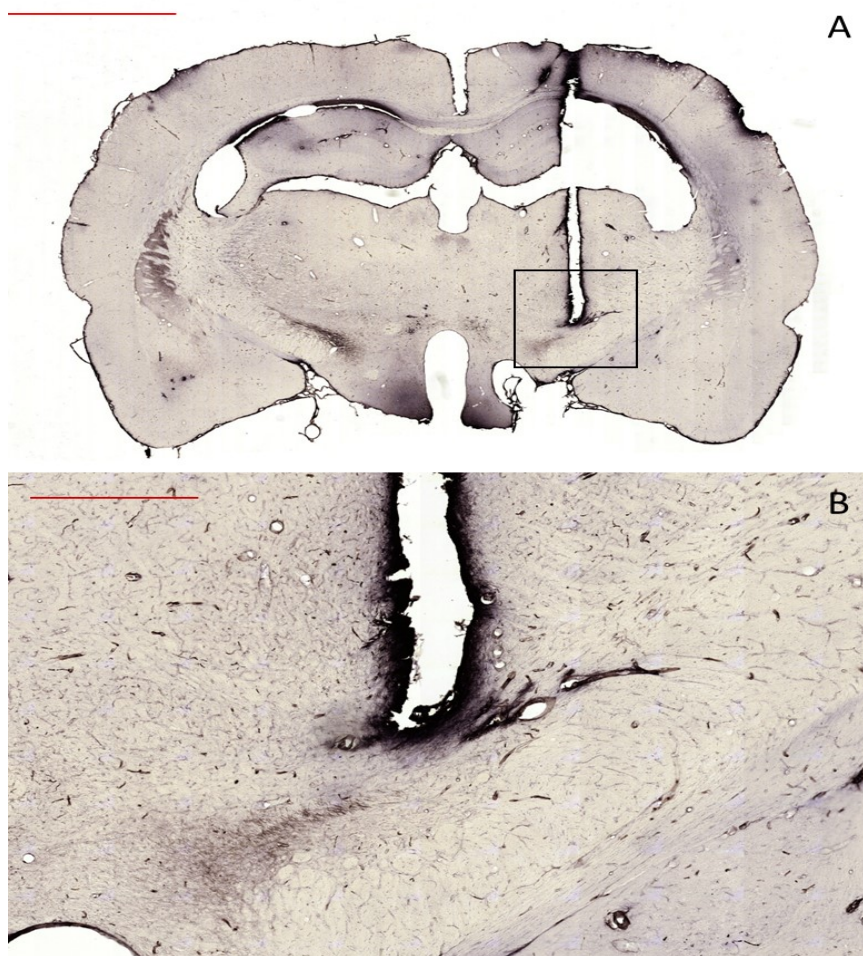
Die verwendeten Materialien sind der Tabelle im **Anhang A** zu entnehmen. Sofern spezielle Materialien und Chemikalien verwendet wurden, sind diese aus Gründen der Übersichtlichkeit an der Stelle ihrer Verwendung bezeichnet.

2.2 Tiere

Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um männliche Wistar Han Ratten der Versuchstierlinie Crl:WI(Han) (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Die 6-OHDA-Läsion wurde bei Ratten mit einem Gewicht von 280-320g durchgeführt. Die Haltungsbedingungen entsprachen den Richtlinien, wobei ein 12h Tag/Nacht-Zyklus und geforderte klimatisierte Bedingungen (ca 22°C und 40% relative Luftfeuchte) automatisch kontrolliert wurden. Die Ratten erhielten ein Alleinfuttermittel in Pelletform (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Trinkwasser in Überkopfflaschen zur uneingeschränkten Entnahme. Die Reinigung der Käfige erfolgte einmal pro Woche. Nach operativen Eingriffen wurden paarweise gehaltene Ratten vereinzelt. Die Tierversuche wurden in Einklang mit der EU-Tierversuchsrichtlinie 86/609/EWG zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt. Die Kontrolle unterlag hierbei der örtlichen Tierschutzbehörde des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (Az: LALLF M-V/TSEM/7221.3-1.2-019/10).

2.3 Tiermodell und Tiefe Hirnstimulation

Die für diese Arbeit relevante 6-OHDA Läsion, die Implantation sowie Konstruktion der Stimulatoren und die Durchführung der Verhaltenstests wurden von Dr. rer. nat. Kathrin Badstübner-Meeske durchgeführt und sind nicht durch den Verfasser dieser Arbeit durchgeführt worden. Sie werden im Folgenden trotzdem aus Gründen der

**Abbildung 3: Elektrode im STN**

Dargestellt sind Aufnahmen eines TH gefärbten 30 μm dicken Frontalschnittes einer Ratte mit einseitig im STN implantierter Elektrode. (A) Übersicht mit Darstellung des gesamten Kanals der Elektrode. (B) Ausschnittsvergrößerung aus der Kontaktzone der Elektrode mit dem STN. Der Maßstabsbalken in A entspricht 1 mm, der in B entspricht 200 μm .

Vollständigkeit kurz erwähnt. Details zu Elektrodengeometrien, Stimulationsbedingungen und technischer, bzw. praktischer Umsetzung können dem Material- und Methodenteil von Badstuebner et al. 2017a und b entnommen werden (1, 102). Die unilaterale Läsion des medialen Vorderhirnbündels (MVB) erfolgte mit 6-OHDA. Zur Stimulation der Tiere wurden uni- und bipolare Pt/Ir-Elektroden entworfen und den Ratten in einer stereotaktischen Operation im *Nucleus subthalamicus* implantiert. Die Koordinaten der Implantation waren nach Bregma anterior-posterior = -3,8 mm, medial-lateral = -2,4 mm und dorsal-ventral = -7,6 mm (nach dem Rattenhirnatlas von Paxinos und Watson 2007 (103)). Die Ratten konnten sich mit dem Stimulator auf dem Rücken frei bewegen, was

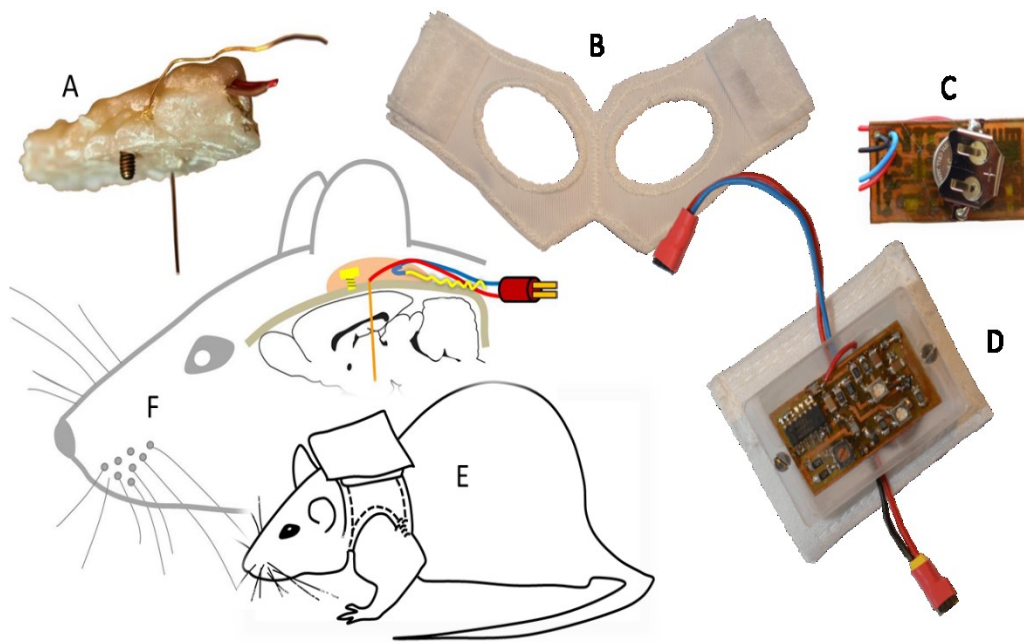


Abbildung 4: Instrumentierung der Ratte

Darstellung der chronischen Instrumentierung mit allen Bauteilen. (A) vollständiger, explantierter THS-Aufbau. (B) Textiler Anteil des „Rucksacks“ mit Klettverschluss und beziehbarer Weste. (C) Stimulatorplatine mit Batterie. (D) Das zu B gehörige integrierte elektronische Bauteil mit Stimulatorplatine und Kabeln. (E) Skizze einer Ratte mit aufgesetzter Instrumentierung. (F) Skizze einer Schnittansicht der Ratte mit implantierter Elektrode und chronischer Instrumentierung, (Abbildung bereitgestellt durch Dr. rer. nat. K. Badstübner-Meeske, modiziert (1)).

das Besondere an der gewählten Methodik darstellt. Die Stimulationsparameter wurden wie folgt gewählt: konstante Strompulse mit $60\ \mu\text{s}$, $200\ \mu\text{A}$ bei einer Frequenz von 130 Hz.

2.4 Versuchsablauf

Der genaue Versuchsablauf ist **Abbildung 5** zu entnehmen und ist nochmals detaillierter im **Anhang B** abgebildet. Die Tiere wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten getestet: Vor der Läsion, nach der Läsion sowie am Ende des jeweiligen Stimulationszeitraumes. Wurde ein Tier nicht läsioniert oder stimuliert, so wurden die Zeitpunkte dennoch vergleichbar gewählt. Nach erfolgter 6-OHDA Applikation wurde den Ratten sechs Wochen Erholungsphase eingeräumt bis zur operativen Elektrodenimplantation und zwei weitere Wochen bis zum Start der Stimulation.

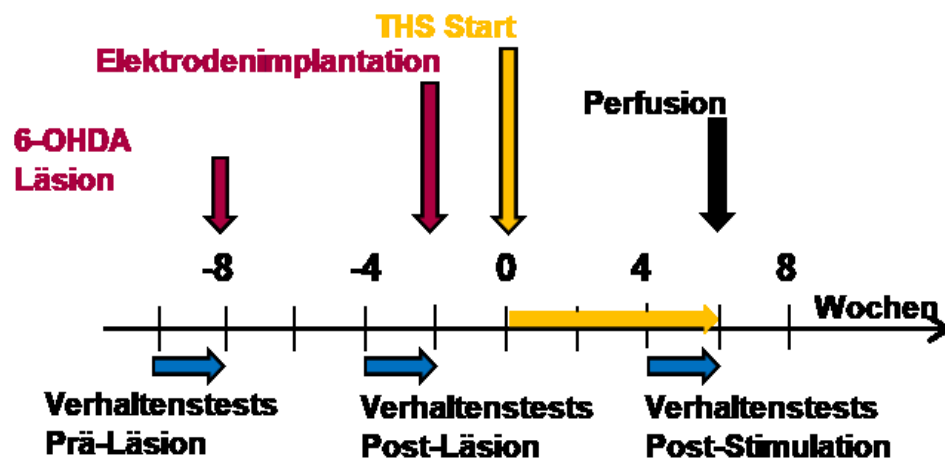


Abbildung 5: Versuchsablauf

Dargestellt ist der Versuchsablauf anhand einer Zeitachse. Die Zahlen geben die Zeit in Wochen an. Der Beginn der Stimulation wurde als Zeitpunkt 0 gewählt. Die Läsion und operative Elektrodenimplantation sind mit vertikalen roten Pfeilen gekennzeichnet. Der Stimulationsbeginn ist mit einem vertikalen gelben Pfeil gekennzeichnet und die Dauer der Stimulation auf der Zeitachse mit einem horizontalen gelben Pfeil. Zu beachten ist, dass dieser Zeitraum zwischen den Gruppen variiert und in dieser Abbildung exemplarisch auf 6 Wochen gesetzt wurde. Zum Abschluss der Stimulationsphase erfolgte die Perfusion der Tiere, gekennzeichnet mit vertikalem schwarzen Pfeil. Verhaltenstests fanden zu verschiedenen mit blauen horizontalen Pfeilen gekennzeichneten Zeiträumen statt, (Abbildung bereitgestellt durch Dr. rer. nat. K. Badstübner-Meeske).

2.5 Verhaltenstests

Es wurden zwei Tests aus mehreren durchgeführten Verhaltenstests näher betrachtet. Der Open-Field-Test als überwiegend nichtmotorischer Test zur Quantifizierung des Ängstlichkeitsverhaltens und der Stepping-Test als motorischer Test zur Quantifizierung der Bradykinese.

2.5.1 Open-Field-Test

Beim Open-Field-Test handelt es sich um einen definierten Verhaltenstest zur Erfassung bestimmter Reiz-Reaktions-Beziehungen und anderer Verhaltensinteraktionen der Tiere auf die Umwelt. Der Test wurde 1932 durch Hall und Ballachey etabliert (104). Es gibt zwei Varianten des Tests, eine, bei der das Tier in einen umwandeten Raum gesetzt wird (erzwungenes open-field-Verhalten) und einen bei dem das Tier aus einer Box nach eigener „Entscheidung“ das Feld betreten kann (freiwilliges open-field Verhalten). Für

diese Arbeit wurde die Variante „erzwungenes open-field-Verhalten“ durchgeführt. Für den Test wurde eine selbstkonstruierte 46x45x40cm³große Polykarbonat Box verwendet. Wichtig war außerdem, dass die Helligkeit, Umgebungsgeräusche und Raumtemperatur konstant gehalten wurden. Die Tiere wurden für 10 Minuten mit einer Kamera aufgezeichnet und die Parameter „insgesamt zurückgelegte Wegstrecke“ sowie „Verhältnis der Wegstrecke im Zentrum zur Gesamtwegstrecke“ bestimmt. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse des Open-Field-Tests zur Beurteilung des Ängstlichkeitsverhaltens der Tiere herangezogen. Die Grundlage hierfür ist, dass der Test spezifisch phylogenetisch geprägtes Angstverhalten der Tiere auf spezifische Stimuli adressiert. Zu diesen natürlich aversiven Stimuli gehören die Exposition gegen helles Licht sowie eine unbekannte offene Umgebung ohne Rückzugsmöglichkeit (105, 106). Als Limitation des Testes gilt, dass wiederholte Exposition zu Gewöhnungseffekten führt. Innerhalb dieses Versuches wurden die Tiere insgesamt drei Mal für je eine Stunde dem open field ausgesetzt.

2.5.2 Stepping-Test

Beim Stepping-Test handelt es sich um einen Test, der die Bradykinese des Tieres quantifizieren soll, also ein Testverfahren zur Prüfung der Motorik. Der Stepping-Test wurde nach Olsson et al. durchgeführt (107). Mit dem können verschiedene Parameter gemessen werden. Zum einen die Schrittzahl in Vor- und Rückhandrichtung und zum anderen die Schrittinisierungszeiten. Für diese Arbeit wurde ausschließlich der Wert: Schrittinisierungszeit betrachtet. Hierbei wurden die Ratten mit einem bestimmten beidhändigen Griff fixiert und anschließend ein Anreiz zur Schrittausführung gegeben, wie z.B. die Aussicht auf den Heimatkäfig. Anschließend wurde die Zeit bis zur Initiation des ersten Schrittes gemessen.

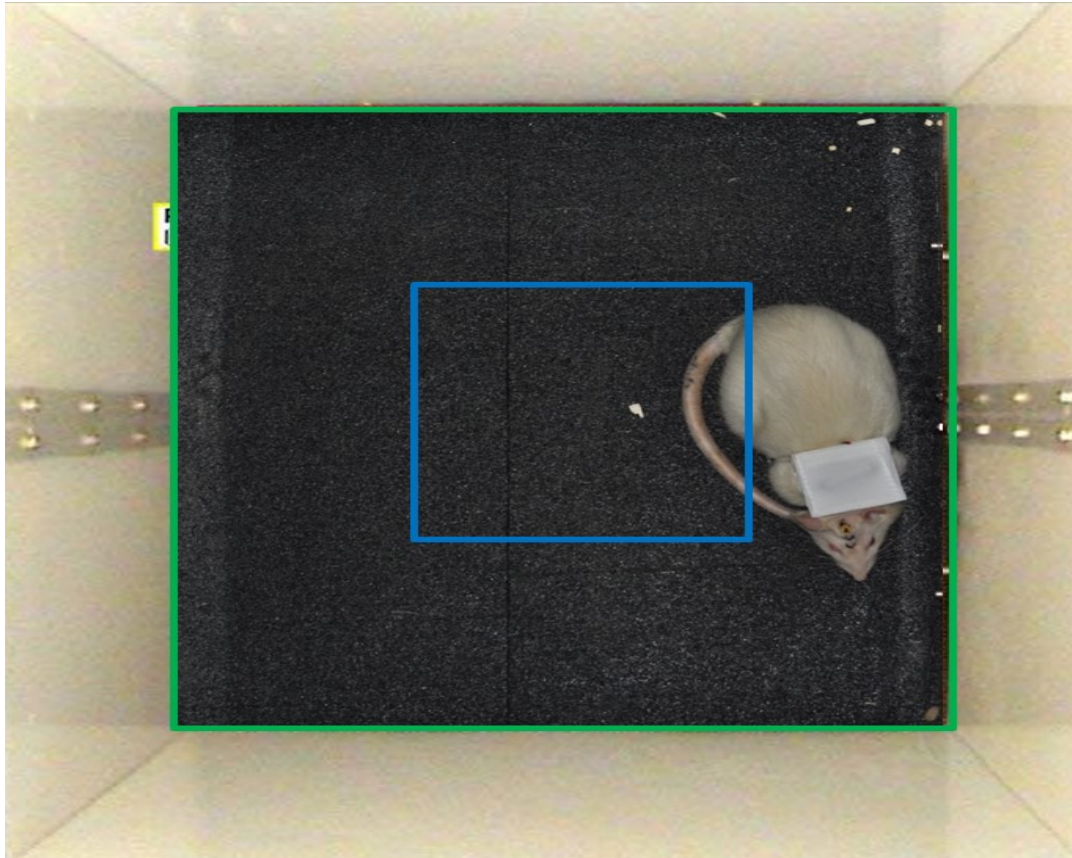


Abbildung 6: Open-Field-Test

Kameraansicht des Open-Field-Tests. Dargestellt ist eine Ratte mit chronischer Instrumentierung, welche sich im Randbereich der Box befindet. Grüne Zone: Peripherie, blaue Zone: Zentrum, (Abbildung bereitgestellt durch Dr. rer. nat. K. Badstübner-Meeske).

2.6 Kryostatschnitte

Das Protokoll zur Anfertigung der Kryostatschnitte ist **Anhang C** zu entnehmen. Zur Anfertigung der Kryostatschnitte mussten die Gehirne zunächst fixiert und entwässert sowie tiefgefroren vorliegen. Dazu wurden die Ratten nach Abschluss der Versuche mit Paraformaldehyd perfundiert und die Hirne entnommen. Zur Kryokonservierung wurde die Arbeitskammer des Kryostaten 30 Minuten vor Beginn der Arbeit auf -30°C eingestellt. Dann wurden kleine quadratische Alufolien vorbereitet und in den Kryostaten gelegt sowie kleine Papierschnipsel mit den entsprechenden Tiernummern beschriftet und beigelegt. Isopentan, welches bei -80°C in Flaschen zu 250 ml gelagert wurde, wurde in einen im Kryostaten stehenden Plastikbecher gefüllt, welcher sich seinerseits in einem Styroporzylinder befand. Die Temperatur des Isopentan beim Absinken der Hirne betrug -50°C bis -60°C . Das Rattengehirn wurde vorsichtig mit einer Pinzette für 5

**Abbildung 7: Stepping-Test**

Dargestellt ist die Durchführung des Stepping Tests zur Bestimmung der Initiationszeit der Vor-derpfote. Der Ratte wurde ein Anreiz zur Schrittmotivation in Form ihres Heimatkäfigs gegeben. Dabei wurde die Zeit bis zur Initiierung des ersten Schrittes gemessen. Es wurden abwechselnd die Zeiten der kontralateral und ipsilateral zur stimulierten Hemisphäre liegenden Extremitäten bestimmt. (Abbildung bereitgestellt durch Dr. rer. nat. K. Badstübner-Meeske)

Minuten in das vorbereitete Isopentan gegeben. Danach zum Aufsaugen Feuchtigkeit auf ein handelsübliches Küchenpapier gelegt und anschließend auf die zugeschnittene Alufolie zusammen mit dem Papierzettel mit der Tiernummer eingewickelt. Die so vorbereiteten Gehirne wurden bei -80°C gelagert. Die $30\text{ }\mu\text{m}$ dicken Kryostatschnitte wurden mit einem Kryostaten angefertigt. Hierzu benötigte man zunächst eine Kryoprotektionslösung aus 30% Ethylenglycol und 25% Glycerin gelöst in PBS. Bevor die Gehirne dem Schneideprozess im Kryostaten unterzogen wurden, ruhten sie zunächst für 30 Minuten in der Kammer. Danach wurde mittels Tissue Tek auf einer dafür vorgesehenen Aufnahmevorrichtung ein Plastikzylinder gerade positioniert und festgefroren. Für die sogenannte flat skull-Position des Gehirns ist es wichtig, dass dieser Zylinder gerade sitzt. Anschließend wurde ein Tropfen Tissue Tek innen an den Rand des Zylinders gegeben, das Gehirn mit einer Pipette gegriffen und mit der langen Stirnseite an den inneren Rand des Zylinders möglichst gerade aufgesetzt. Unter optischer Kontrolle wurde das

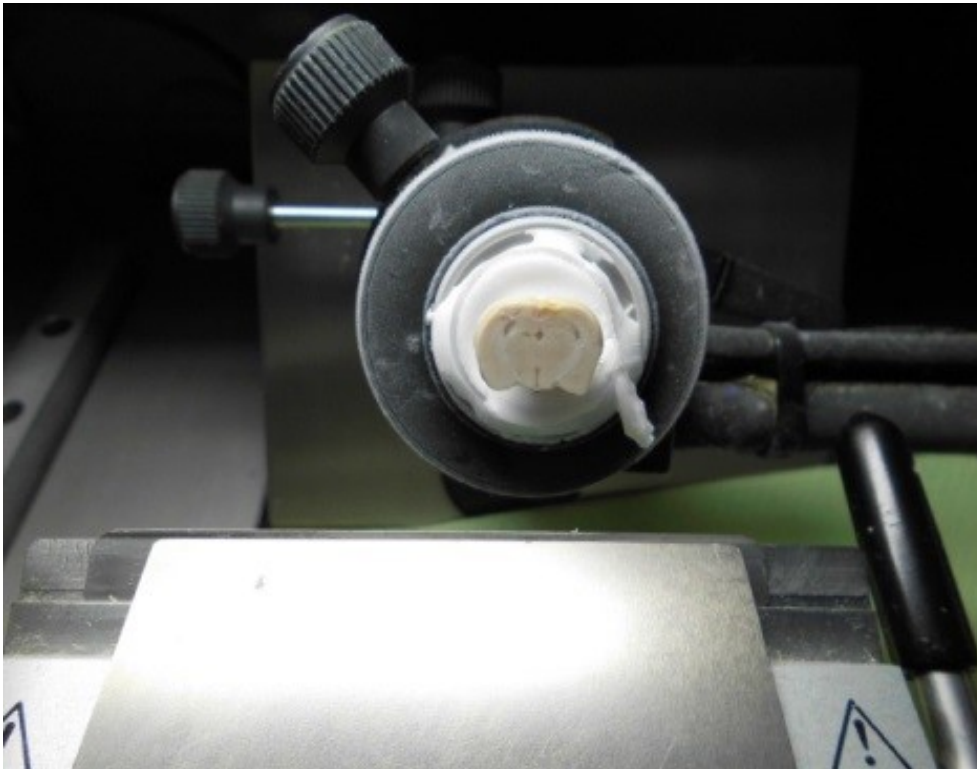


Abbildung 8: Rattenhirn im Kryostaten

Im Kryostaten eingespanntes Rattengehirn, welches bereits angeschnitten wurde. Man erkennt die Einbettung mittels Tissue Tek sowie den Schneidetisch mit einer eingespannten Klinge.

Gehirn in dieser Position angefroren. Den Plastikzylinder konnte man anschließend durch vorsichtiges Drehen wieder entfernen. Um einen sicheren Sitz auf der Unterlage zu gewährleisten war es nötig das Gehirn nochmals mit Tissue Tek zu ummanteln. Anschließend wurde die Aufnahmevorrichtung eingespannt und adjustiert werden, damit der Anschnitt gerade erfolgt. In unserem Modell wurde der Cortex nicht benötigt und konnte daher zur Markierung der rechten Seite mit einer Rasierklinge angeschnitten werden, um später die linke von der rechten Hemisphäre unterscheiden zu können. In der Hirnstammregion wurde nach selbigem Prinzip mit einer Kanüle im basalen Bereich der rechten Seite eingestochen. Die Schnittdicke wurde am Kryostaten auf 30 μm eingestellt, die Kammertemperatur betrug -21°C bei einer Objekttemperatur von -18°C . Der Schneidewinkel wurde auf $0-3^{\circ}$ justiert. Die Schnitte wurden mit einem Pinsel, welcher zwischendurch mit PBS gespült wurde, in 12-Well-Mikrotiterplatten mit der vorbereiteten Kryoprotektionslösung überführt.

Das Schneideschema wurde wie folgt festgelegt:

Im Bereich Bregma +2,8 bis -3,0 mm befand sich die Region des *Nucleus caudatus/Putamen* (CPu), hier wurden vier Well-Reihen mit Schnitten befüllt. Dabei wurde immer bei 3 Schnitten pro Well die Platte gewechselt. In den darauffolgenden vier Abschnitten wurden immer nur drei Well-Reihen befüllt. Im zweiten Bereich von Bregma -3,0 bis -4,2 mm befand sich der *Nucleus subthalamicus*. In der dritten Region Bregma -4,2 bis -6,7 mm lag die *Substantia nigra*. Die vierte Region Bregma -6,7 bis -8,8 mm enthielt den *Nucleus pedunculopontinus tegmentalis* (PTg). Der letzte Bereich ab Bregma -8,8mm wurde kontinuierlich bis zum Ende geschnitten. Das Schema wurde so festgelegt um immer je einen Well für die Nissl Färbung, einen für die TH-Färbung und einen als Backup zu erhalten. Im Bereich CPu wurde zusätzlich noch ChAT gefärbt, daher erfolgte die Aufteilung in vier Reihen. Die Schnittbereiche beziehen sich auf die Koordinaten aus dem Rattenhirnatlas nach Paxinos und Watson [2007] (103) und wurden durch optische Kontrolle festgelegt.

2.7 Immunhistochemie

2.7.1 Tyrosinhydroxylase Färbung

Die Immunhistochemische Färbung von dopaminergen Neuronen erfolgte mittels Tyrosinhydroxylase (TH) - Färbung. Dabei werden nur die Neurone angefärbt, welche das genannte Enzym besitzen. Die Färbung ist nicht spezifisch für dopaminerge Neurone, sondern färbt auch andere monoaminerge Zellpopulationen an, wie beispielsweise die noradrenergen Neurone des *Locus coeruleus*. Dies erklärt sich aus dem Stoffwechselweg in welchem die TH eine Hydroxylierung der Aminosäure L-Tyrosin katalysiert, wodurch L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) entsteht. Vom L-DOPA ausgehend wird über eine durch die DOPA-Decarboxylase vermittelte Decarboxylierung zunächst Dopamin synthetisiert und anschließend über weitere Enzyme durch Hydroxylierung Noradrenalin und von diesem durch Methylierung Adrenalin. Die Katecholaminsynthese vom Tyrosin ausgehend ist in **Abbildung 9** detailliert dargestellt. Durch die Lokalisation der TH⁺ Neurone ist jedoch eine Zuordnung zum dopaminergen bzw. noadrenergen Phänotyp gut möglich und etabliert.

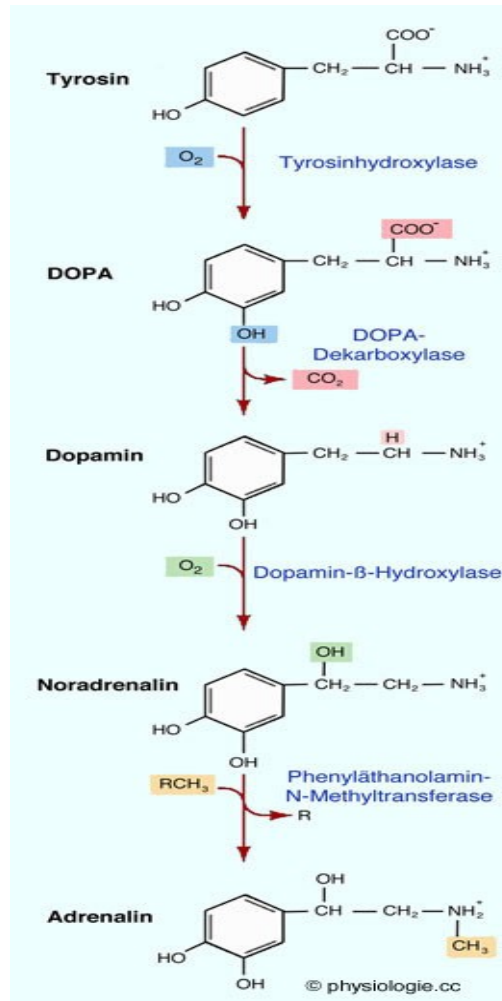


Abbildung 9: Stoffwechsel der Katecholamine¹

Dargestellt ist der Stoffwechsel der Katecholamine von der Aminosäure Tyrosin ausgehend. Tyrosin wird über die Tyrosinhydroxylase zu DOPA (Dihydroxyphenylalanin) hydroxyliert. DOPA wird über die DOPA-Decarboxylase zu Dopamin decarboxyliert. Im Falle dopaminerger Neurone endet der Stoffwechselweg an dieser Stelle. Noradrenerge Neurone enthalten zusätzlich Dopamin-β-Hydroxylase, welche Noradrenalin synthetisiert. Adrenerge Neurone des Nebennierenmarkes sind außerdem in der Lage durch Methylierung aus Noradrenalin Adrenalin herzustellen.

Bei dieser Färbemethode wurde zur Visualisierung der TH-Immunreaktivität Diaminobenzidine (DAB) genutzt. Dabei handelt es sich um ein Derivat des Benzen, welches häufig in immunhistochemischen Prozeduren genutzt wird. Unspezifische Bindungen von Antikörpern wurden mit einer Blockierungslösung (Pferde-Serum und bovines Serum-Albumin) verhindert. Das in der Blockierungslösung enthaltene TritonX100 dient als Detergenz zur Erhöhung der Gewebsspermeabilität um die Penetration der Antikörper zu

¹ Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. H. Hinghofer-Szalkay - physiologie.cc

erleichtern. Der Primärantikörper war gegen TH gerichtet, der sekundäre Antikörper ist ein am C-terminalen Ende mit Biotin konjugierter Antikörper. Hierbei dient das Biotin als Bindepartner für Avidin, welches wiederum mit Meerettichperoxidase konjugiert ist. Das Wasserstoffperoxid bewirkt mit der Peroxidase eine Oxidation des DAB, welches braun ausfällt. Nickelchlorid dient hierbei der Signalverstärkung, da es lokal mit DAB präzipitiert. Die Färbung erfolgte über zwei bis drei Tage.

Der genaue Ablauf der Immunhistochemischen TH-Färbung mit allen notwendigen Reagenzien kann dem Protokoll im **Anhang D** entnommen werden. Zunächst werden die Schnitte mittels Pinsel aus der Kryolösung in vorher beschriftete 12-Well Mikrotiterplatten mit PBS gegeben, wobei immer 3 Schnitte in einem Well platziert wurden. Es erfolgten 2 Waschschrte von je 10 min auf einem laborüblichen Schüttler (Lab4you, OS-20) bei 90 *rotations per minute* (rpm), wobei die Schnitte zwischendurch immer wieder in ein Well mit frischem PBS überführt werden. Als Überführungshilfe wurden 15mm Siebe benutzt (Costar 3477, Netwell Permeable Supports). Anschließend war es nötig die endogene Peroxidase zu blocken, um falsch positive Reaktionen zu verhindern. Hierzu wurden die Schnitte für 15 min in 3%igem Wasserstoffperoxid in PBS bei Raumtemperatur erneut mit 90 rpm geschüttelt. Daraufhin war es nötig die Schnitte erneut zwei Mal für je 10 min mit PBS nach o.g. Procedere zu waschen, um überschüssiges Wasserstoffperoxid zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen für Antikörper geblockt. Ein Schritt, der ebenfalls zwingend notwendig war, um falsch positive Reaktionen zu verhindern. Hierbei wurden die Schnitte für eine Stunde in 3%igem, biotinfreien BSA und einer 1:67 Lösung von normalem Pferdeserum (normal horse serum, NHS) in 0,05%igem TritonX100 in PBS bei Raumtemperatur und 70rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte die erste Antikörperinkubation mit dem primären Antikörper (anti-TH-AK). Die Verdünnung der Antikörperlösung wurde 1:1000 angefertigt in 1%igem BSA mit 0,025%igem TritonX100 in PBS. Ein Well musste mit PBS gefüllt werden und diente als Negativkontrolle. Die Inkubation musste über Nacht bei 4°C im Kühlschrank erfolgen, erneut unter schütteln mit 70 rpm.

An Tag 2 wurde dann zunächst wieder zwei Mal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die zweite Antikörperinkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper. Dieser wurde

in einer Verdünnung von 1:200 in einer Lösung mit 1%igem BSA mit 0,025%igem TritonX100 in PBS angewendet. Erneut war die Inkubation bei 4°C über Nacht nötig, alternativ ist aber auch ein Schema mit zwei stündiger Inkubation bei Raumtemperatur und 70 rpm möglich.

An Tag 3 musste zunächst die ABC-Lösung vorbereitet werden. Hierzu wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-KIT, Vectastain Elite) 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem laborüblichen Magnetrührer (Roth) vorinkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut zwei Mal in PBS gewaschen. Die gewaschenen Schnitte mussten danach für eine Stunde in ABC-Lösung bei Raumtemperatur und 70 rpm inkubieren. Nach der Inkubation erfolgten wieder zwei Waschschrte. Die Vorbereitung der DAB-Lösung erfolgte nach einer mit dem KIT mitgelieferten Anleitung. Es wurden destilliertes Wasser mit Buffer stock, DAB stock, Wasserstoffperoxidase Lösung sowie Nickel in einem spezifischen Mischungsverhältnis (Bufferstock:DABstock:Wasserstoffperoxidase-Lösung:Nickel = 1:2:1:1) vorbereitet. Diese Lösung wurde anschließend auf Well Platten verteilt und die Schnitte hinzugegeben. Dabei musste darauf geachtet werden nicht länger als 2-5 min zu inkubieren, da sonst die Schnitte überfärbt wurden. Die Färbereaktion wurde abgestoppt, indem die Schnitte in neue Wells mit PBS überführt wurden und anschließend erneut vier Mal gründlich gewaschen wurden. Die Schnitte konnten in dieser Form für mehrere Tage bei 4°C gelagert werden.

Für das Aufziehen der gefärbten Schnitte auf Objektträger musste zunächst eine Schale mit PBS vorbereitet werden. In diese wurden nacheinander je 3 Schnitte aus einem Well gegeben und vorsichtig mit einem Aquarellmalpinsel (NeoLab, Rotmarderhaar, 9951) auf Objektträger aufgezogen. Dabei musste darauf geachtet werden, die Schnitte in der richtigen Reihenfolge von rostral nach caudal anzuordnen. Hierzu wurde als Vorlage der Rattenhirnatlas von Paxinos und Watson [2007] (103) genutzt. Die Schnitte mussten anschließend auf den Objektträgern für 30 min bei Raumtemperatur lufttrocknen. Zum Eindecken wurde zunächst zwei Mal für 5 Minuten in Xylen (Dimethylbenzen) gut gespült und anschließend mit Deckgläsern in Leica Mount (Leica, Wetzlar, D) eingedeckt.

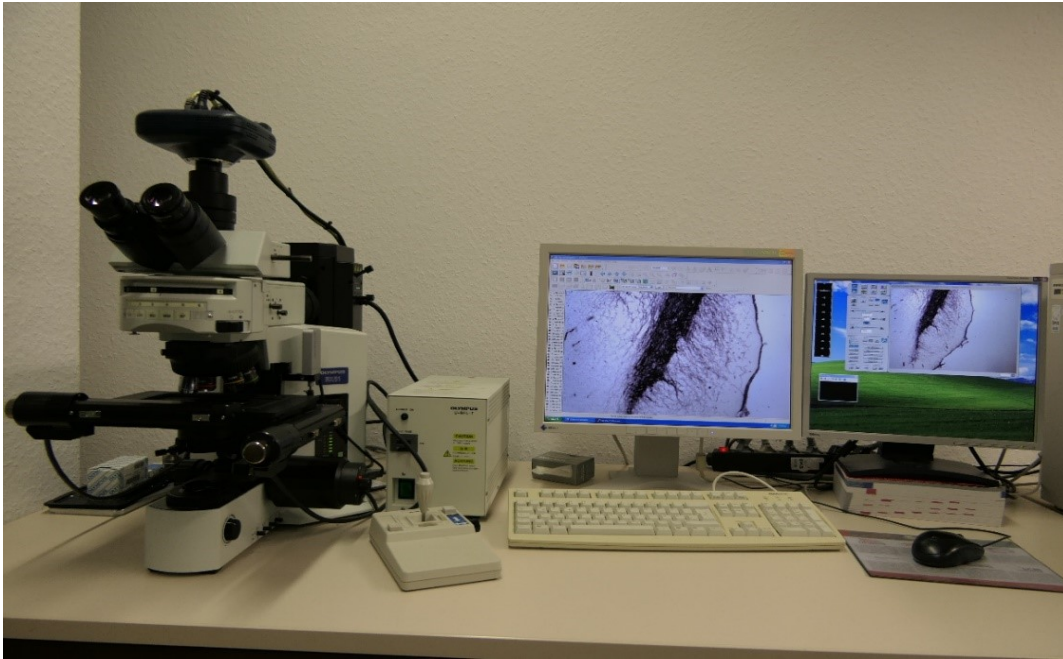


Abbildung 10: Arbeitsaufbau Stereologie

2.8 Stereologie

Als histologische Parameter wurden die Zelldichten TH⁺ Neurone in drei verschiedenen Regionen bestimmt: *Substantia nigra, pars compacta* (SNpc), *Area tegmentalis ventralis* (VTA) und *Locus coeruleus* (LC). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Stereo-Investigator-Analyse. Hierfür wurde die Stereo-Investigator-Software (v8.0, MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA) herangezogen. Außerdem benötigt wurde ein Lichtmikroskop (BX 51, Olympus, Tokyo, Japan), eine Digitalkamera (CX9000, MicroBrightField Bioscience, Vermont, USA), ein PC mit Bildschirm (64-BIT Windows-XP) sowie ein ansteuerbarer Objektträgertisch (MT12; Heidenhain, Traunreut, Germany) zur Bewegung des Objektisches.

Bei der Stereologie handelt es sich um eine 1961 von Hans Elias entwickelte Methode zur Gewinnung quantitativer Strukturinformationen über biologische Objekte. Das Problem, welches von der Stereologie gelöst wird ist, dass man i.d.R. bei histologischen Untersuchungen keine vollständige 3D-Struktur, sondern lediglich eine Art „Flachland Auswahl“ des Gewebes untersucht. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit eine Methode zu finden, die die Möglichkeit zur dreidimensionalen statistischen Rekonstruktion bietet.

Die Zählung arbeitet nach dem Paradigma „do more less well“, versucht also einen präzisen Schätzwert mit einem akzeptablen Aufwand zu generieren. Dabei soll der Untersucher weniger Zeit pro Testfeld verbringen, dafür aber mehr Testfelder zählen oder eine höhere Anzahl von Schnitten des jeweiligen Organs auswerten (108–110).

Als stereologische Methode wurde zur Quantifizierung der Neurone das Prinzip des optical fractionator angewendet (111–113). Bei dieser stereologischen Methode handelt es sich um eine Kombination aus dem „*optical dissector*“ (111) und dem „*fractionator*“ (114). Der Experimentator zählt hierbei Subvolumina durch und extrapoliert diese später mittels einer Software auf die gesamte Zellpopulation. Bei dieser Methode sollte unbedingt eine hohe Schnittdicke gewählt werden (in dieser Arbeit 30 μm).

Die Software erzeugt dann einen virtuellen Raum, den „*optical dissector*“. Die Oberfläche des optical dissector ist der „*counting frame*“ oder Zählrahmen. Innerhalb dieses Zählrahmens wird nach bestimmten Regeln gezählt: Es dürfen nur diejenigen Objekte oder Zellen gezählt werden, deren Somata innerhalb der Höhe des „*dissectors*“ scharf zur Darstellung kommen. Als Zählpunkt wird hierbei eine virtuelle Tangente auf die Spitze der Zelle gelegt, der Berührungspunkt ist dabei der Zählpunkt. Liegt dieser Punkt innerhalb des Zählrahmens, darf die Zelle gezählt werden (**Abbildung 11**, Objekt 2).

Schneidet die Zelle eine Begrenzung des Rahmens, darf sie nur gezählt werden, wenn sie den oberen oder rechten (mit grün markierten) Rand schneidet (**Abbildung 11**, Objekt 3). Wird dagegen der untere oder linke Rand tangiert, wird die Zelle nicht gezählt (**Abbildung 11**, Objekt 1).

Der „*optical dissector*“ wird entlang der Höhe h , welche der Z-Achse unter dem Mikroskop entspricht durchgemustert. Kombiniert wurde der „*optical dissector*“ mit der „*fractionator*“-Methode, indem viele verschiedene Dissektoren über die gesamte, vorher markierte, Region des Interesses (*region of interest* = ROI) verteilt wurden.

Dies geschah nach vorher eingestellten Regeln, indem man die Größe des Zählrahmens und des sogenannten „*sampling grids*“ wählt. In einer großen Region mit vielen Zellen wählt man einen eher großen „*sampling grid*“, in kleinen Regionen mit wenigen Zellen

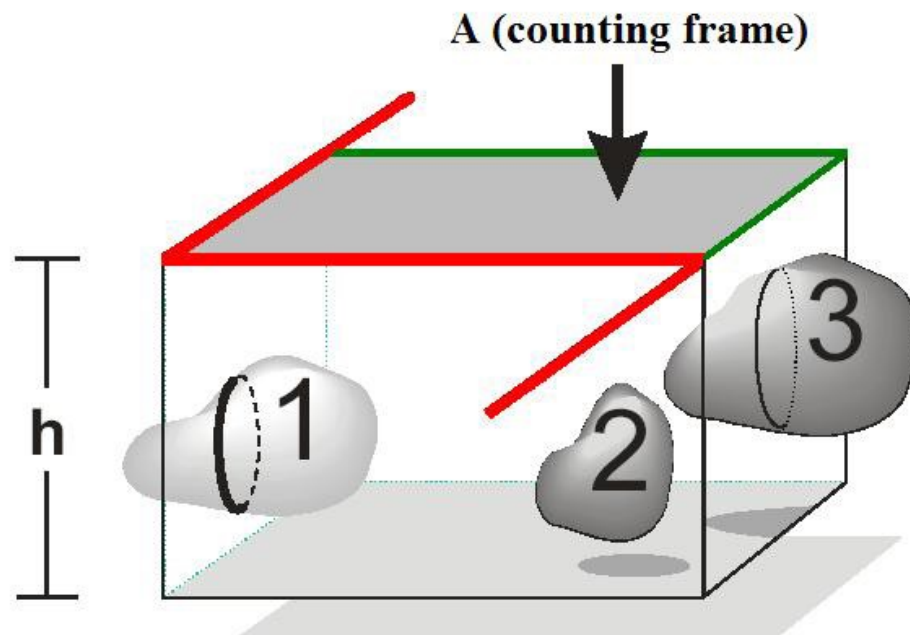


Abbildung 11: Optical dissector und counting frame

Darstellung des *optical dissector* mit der Höhe h und der Fläche A , definiert als Oberfläche des *counting frame*. Die Objekte 1, 2, und 3 sind drei Neurone im Bereich eines „*optical dissector*“, die die Zählregeln verdeutlichen sollen. (Quelle: Keuker et al. 2001, modifiziert nach Lammel 2004)

einen eher Kleinen. Mit dieser Methode wird es durch eine systematische Verteilung der Dissektoren möglich, nicht die gesamte Region auswerten zu müssen, sondern nur einen Teil von ihr. Wurden alle Dissektoren einer ROI durchgezählt, errechnet die Software anschließend nach folgender Gleichung die Gesamtzahl der Objekte (N).

$$N = \sum Q_i \times \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{tsf}$$

Die hierfür benötigten Werte sind die Summe der pro Schnitt gezählten Zellen (Q_i), die Fraktion des Schnittes („*section sampling fraction*“, ssf , entsprechend jedem dritten Schnitt) die Fraktion der Schnittfläche („*area sampling fraction*“, asf , entsprechend der gewählten Parameter des *sampling grids*) sowie die Fraktion der Schnittdicke („*thickness sampling fraction*“, tsf , entsprechend des Verhältnisses der Höhe h des *optical dissector* zur realen Schnittdicke t von $15\mu\text{m}$). Letztere wurde bei $30\mu\text{m}$ Schnitten auf $15\mu\text{m}$ angepasst, um der erfahrungsgemäß auftretenden, methodisch bedingten Schrumpfung

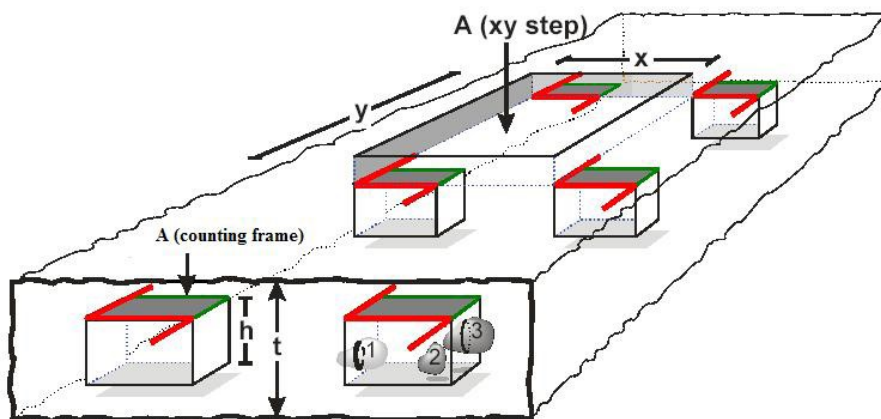


Abbildung 12: Verteilung der optical dissectors über die ROI

Systematische Verteilung der *optical dissectors* über die gesamte ROI. x und y sind die Parameter des *sampling grids*. A ist die Fläche des Selbigen. h bezeichnet die Höhe eines *optical dissectors*. t entspricht der Höhe eines Schnittes ($30\mu\text{m}$) (Quelle: Keuker et al. 2001 (112)).

der Schnitte beim Schneide- und Färbeprozess zu begegnen. Um die Qualität der gewählten Zählparameter zu evaluieren wurde der Fehlerkoeffizient nach Gundersen betrachtet. Dieser sollte möglichst unter 0,05 liegen. Treten hier deutliche Abweichungen auf, müssen die Zählparameter individuell angepasst werden.

2.9 Gruppen

Aus **Tabelle 1** ergeben sich die Beobachtungs- und Kontrollgruppen. Die Bezeichnungen erfolgten nach folgendem System: Wurde ein Tier läsioniert, erhielt es die Bezeichnung „L+“, erfolgte keine Läsion oder lediglich eine Schein-Läsion (sham) erhielt es „L-“. Wurde ein Tier über drei Wochen stimuliert erhielt es die Bezeichnung „S1+“, wurde es dagegen nicht stimuliert oder nur Schein-Stimuliert (sham), aber trotzdem nach Ablauf von drei Wochen Beobachtungszeitraum euthanasiert, erhielt es die Bezeichnung „S1-“. Analog wurde für den Beobachtungszeitraum von sechs Wochen verfahren, wobei „S2+“ für eine Stimulation über weitere drei Wochen, nach schon erfolgten drei Wochen, steht und „S2-“ für keine Stimulation mehr in den letzten drei Wochen. Bei der Gruppe L-S1- handelt es sich um naive, unbehandelte Tiere. Die Gruppen L-S1+ und L-S1+S2+ stellen

Gruppen	Anzahl (n)	Beobachtungszeit- raum	Läsion	Stimulation
L-S1-	n = 5	3 Wochen	Nein	Nein
L-S1+	n = 4	3 Wochen	sham	Ja (bipolar)
L+S1-	n = 4	3 Wochen	Ja	Sham (bipolar)
L+S1+	n = 3	3 Wochen	Ja	Ja (bipolar)
L-S1+S2+	n = 5	6 Wochen	sham	Ja (unipolar)
L+S1+S2+	n = 5	6 Wochen	Ja	Ja (unipolar)
L+S1+S2-	n = 5	6 Wochen	Ja	Ja (unipolar)

Tabelle 1: Gruppenbezeichnungen

die Läsionskontrollen dar, hier wurden die Tiere über drei bzw. sechs Wochen stimuliert ohne die 6-OHDA Läsion im Vorfeld erhalten zu haben. Die Gruppe L+S1- ist demgegenüber als Stimulationsskontrolle zu verstehen, wobei die Tiere zwar 6-OHDA läsioniert, aber lediglich schein-stimuliert wurden.

Die Beobachtungsgruppen sind die Gruppe L+S1+ (Stimulation über drei Wochen) und die Gruppen L+S1+S2+ (Stimulation über sechs Wochen durchgehend) sowie L+S1+S2- (Stimulation über drei Wochen, danach Beobachtung des Tieres über weitere drei Wochen bei abgeschaltetem Stimulator). Da leider die Stimulationsskontrolle für den sechs Wochen Zeitraum (L+S1-S2-) fehlt, wurde im Folgenden stattdessen die drei Wochen Kontrolle für die Analysen verwendet. Dies ist aus inhaltlichen Erwägungen unproblematisch.

2.10 Ausgezählte Regionen

In allen Regionen wurde eine Zelle als solche definiert, wenn sie intakt war, ein deutlicher Nukleolus abzugrenzen war und/oder ein Axon in Verbindung zum Zellkörper gesehen wurde.

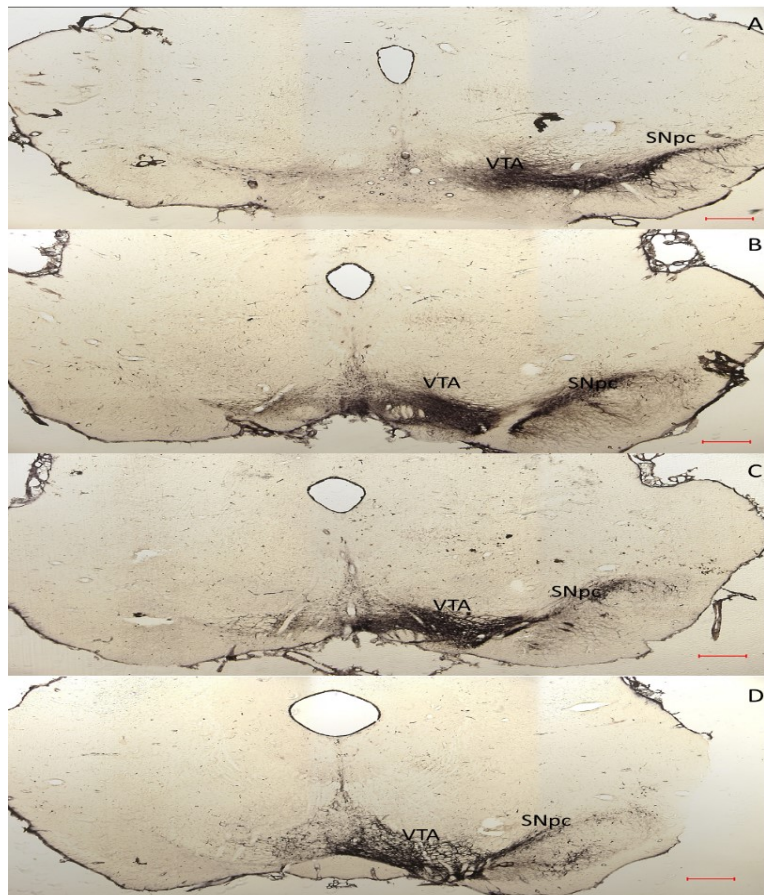


Abbildung 13: Schnittserie VTA/SNpc

Dargestellt sind vier aufeinanderfolgende TH gefärbte Hirnschnitte einer unilateral 6-OHDA läsierten Ratte, auf denen jeweils unterschiedliche Abschnitte der Regionen SNpc und VTA zu erkennen sind. Die jeweiligen Regionen sind dementsprechend bezeichnet und an ihrer TH-Positivität zu erkennen. (A) Auf Höhe von Bregma -4,8 mm. (B) Auf Höhe von Bregma -5,2 mm. (C) Auf Höhe von Bregma -5,52 mm. (D) Auf Höhe von Bregma -5,76 mm. Die Lageangaben wurden mit Hilfe des Paxinos und Watson Rattenhirnatlas (103) bestimmt. Die Maßstabsbalken entsprechen 1 mm.

2.10.1 Substantia nigra pars compacta

In dieser Region wurde die *sampling grid* Größe auf 150 µm x 150 µm gesetzt und die Größe des *counting frames* auf 100 µm x 100 µm. Die *Substantia nigra* besteht aus einer *pars compacta* (SNpc) und einer *pars reticularis* (SNpr), gezählt wurde nur in der *pars compacta*. Die Einteilung erfolgte anhand anerkannter anatomischer Kriterien und wurde mit Hilfe des Rattenhirnatlas von Paxinos und Watson (103) vorgenommen. Die SN befindet sich bei der Ratte zwischen Bregma -6,60 mm und Bregma -4,36 mm. Die

Grenze zwischen der SN und der angrenzenden VTA wurde anhand des Lemniscus medialis vorgenommen und wo dieser weiter rostral nicht mehr vorhanden war, anhand einer gedachten Linie als Verlängerung der von lateral kommenden oberen Grenze der SNpc.

2.10.2 Area tegmentalis ventralis

In dieser Region wurde die *sampling grid* Größe ebenfalls auf 150 µm x 150 µm gesetzt und die Größe des *counting frames* auf 100 µm x 100 µm. Die Abgrenzung zur benachbarten *Substantia nigra* erfolgte wie weiter oben beschrieben. Die VTA als Gesamtkomplex besteht aus den Strukturen: Paranigraler Nukleus (PN), Parainterfaszikulärer Nukleus (PIF), Parabrachialer pigmentierter Nukleus (PBP) und rostrale VTA (VTAR) und wurde auch entsprechend markiert (115). Die VTA der Ratte befindet sich zwischen Bregma -6,60 mm und -4,56 mm. Eine TH gefärbte Schnittserie auf welcher die Regionen SNpc und VTA zu erkennen sind, ist exemplarisch in **Abbildung 13** dargestellt.

2.10.3 Locus coeruleus

In dieser Region wurde die *sampling grid* Größe auf 100 µm x 100 µm gesetzt und die Größe des *counting frames* ebenfalls auf 100 µm x 100 µm. Aufgrund fehlender TH⁺ Nachbarstrukturen musste keine Abgrenzung anhand anatomischer Strukturen vorgenommen werden, sondern es wurde der gesamte TH⁺ Bereich des jeweiligen Schnittes gezählt (siehe **Abbildung 14**). Der *Locus coeruleus* der Ratte befindet sich zwischen Bregma -9,48 und Bregma -10,32. Die retrospektive Auswertung dieser Region war nur bei drei Gruppen möglich, da im Vorfeld systematisch auf die Mitentnahme des Hirnstamms verzichtet wurde.

2.11 Statistik

Die Daten wurden zunächst in Excel (Excel 2003) in eine Tabelle eingetragen und auf Übertragungsfehler und Vollständigkeit überprüft, bevor die Übertragung in das Statistikprogramm SPSS (IBM Statistical Package for Social Sciences, Version 24) erfolgte.

Für die deskriptive Statistik wurden die Häufigkeit (n), der Mittelwert (MW) sowie der

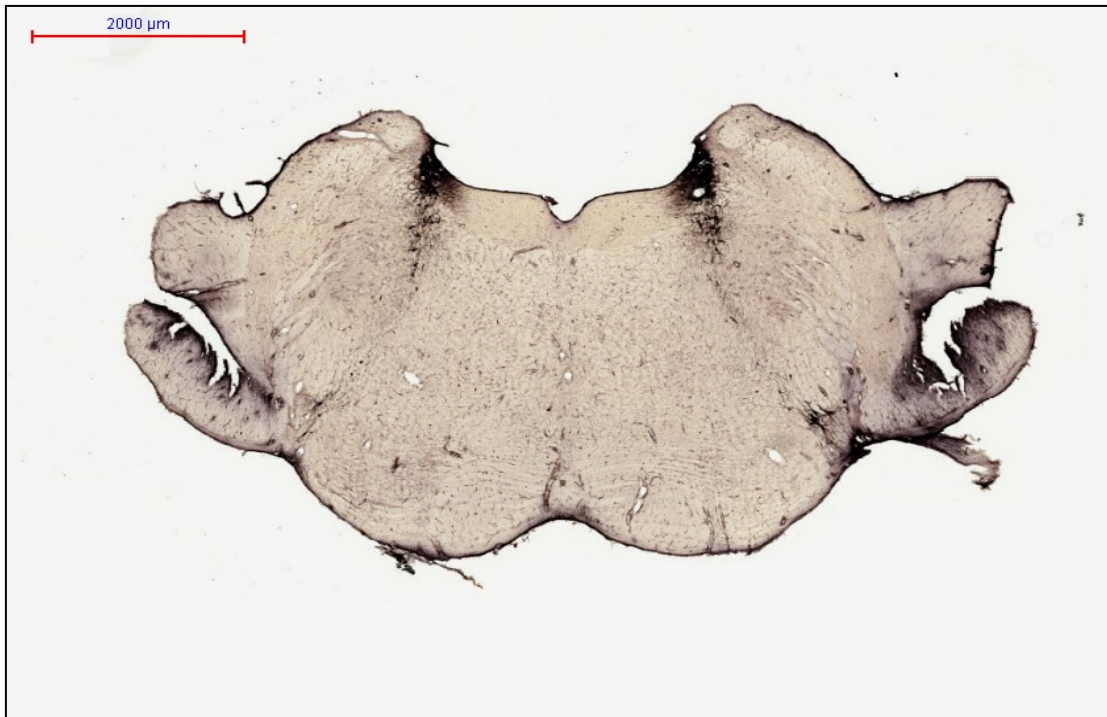


Abbildung 14: 30µm Hirnstammschnitt mit Locus coeruleus

Dargestellt ist ein 30 µm Hirnstammschnitt einer 6-OHDA läsierten Ratte. Deutlich zu erkennen sind die beiden um den vierten Ventrikel liegenden TH⁺ *Loci coerulei*. Der Maßstab ist oben links im Bild angegeben und entspricht 2mm.

Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ermittelt. Die Auswahl der entsprechenden Testverfahren wurde je nach Skalenniveau der Daten gewählt. Auf Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft.

Die statistische Analyse der Verhaltenstests und Zellzahlen wurden bei Gruppenvergleichen zwischen zwei Gruppen mittels Student-t-Test durchgeführt. Wurden dagegen mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Vergleiche der Histologie mit den Verhaltenstests wurden mittels Korrelationsanalysen untersucht und der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt. Für den Effekt der Stimulation auf die Verhaltenstests unter Einbeziehung der Zellzahl als Kovariate wurde eine Kovarianzanalyse (ANCOVA) gerechnet. Als signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert von $p \leq 0,05$ angesehen. Dabei gilt ein Wert von $p \leq 0,001$ als hoch signifikant. Ein statistischer Trend wurde bei Werten von $0,05 < p \leq 0,08$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Substantia nigra pars compacta

3.1.1 Läsionskontrolle

Um die Effektivität der 6-OHDA induzierten Läsionierung in der *Substantia nigra* auch auf zellulärer Ebene zu zeigen, wurden zunächst zwei nicht- bzw. schein-stimulierte Gruppen miteinander verglichen, wobei die Tiere der einen Gruppe 6-OHDA läsiert waren während die Tiere der anderen Gruppe keine solche Injektion erhielten. Im Vorfeld dieser Arbeit diente als Bestätigung über einen ausreichenden Läsionserfolg ein medikamenten-induzierter Rotationstest (mittels Apomorphin).

Abbildung 15 zeigt exemplarisch einen 30 μm – Schnitt auf Höhe der Substantia nigra eines 6-OHDA läsierten Tieres mit Anfärbung der TH⁺ dopaminergen Neurone.

Wie in **Abbildung 16** graphisch dargestellt, hatten Tiere, welchen 6-OHDA injiziert wurde, im Mittel eine Zelldichte von 5.874 Zellen/mm³ auf der zur Läsion ipsilateralen *Substantia nigra* mit einem Standardfehler von 1.324 Zellen/mm³. Dagegen fanden sich bei Tieren, die lediglich eine Injektion mit Zitratpuffer erhalten hatten im Mittel 10.835 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 452 Zellen/mm³. Hierbei zeigten sich signifikant weniger TH⁺ Zellen ($p = 0,006$) in der läsierten Gruppe gegenüber der nicht-läsierten auf der ipsilateral zur Läsion gelegenen Hemisphäre. Auf der zur Läsion kontralateralen Seite zeigten sich erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede. So fanden sich bei den Tieren der Gruppe mit läsiertem MVB im Mittel 17.890 ± 625 Zellen/mm³ gegenüber 15.288 ± 2.125 Zellen/mm³ in der Gruppe ohne Läsion.

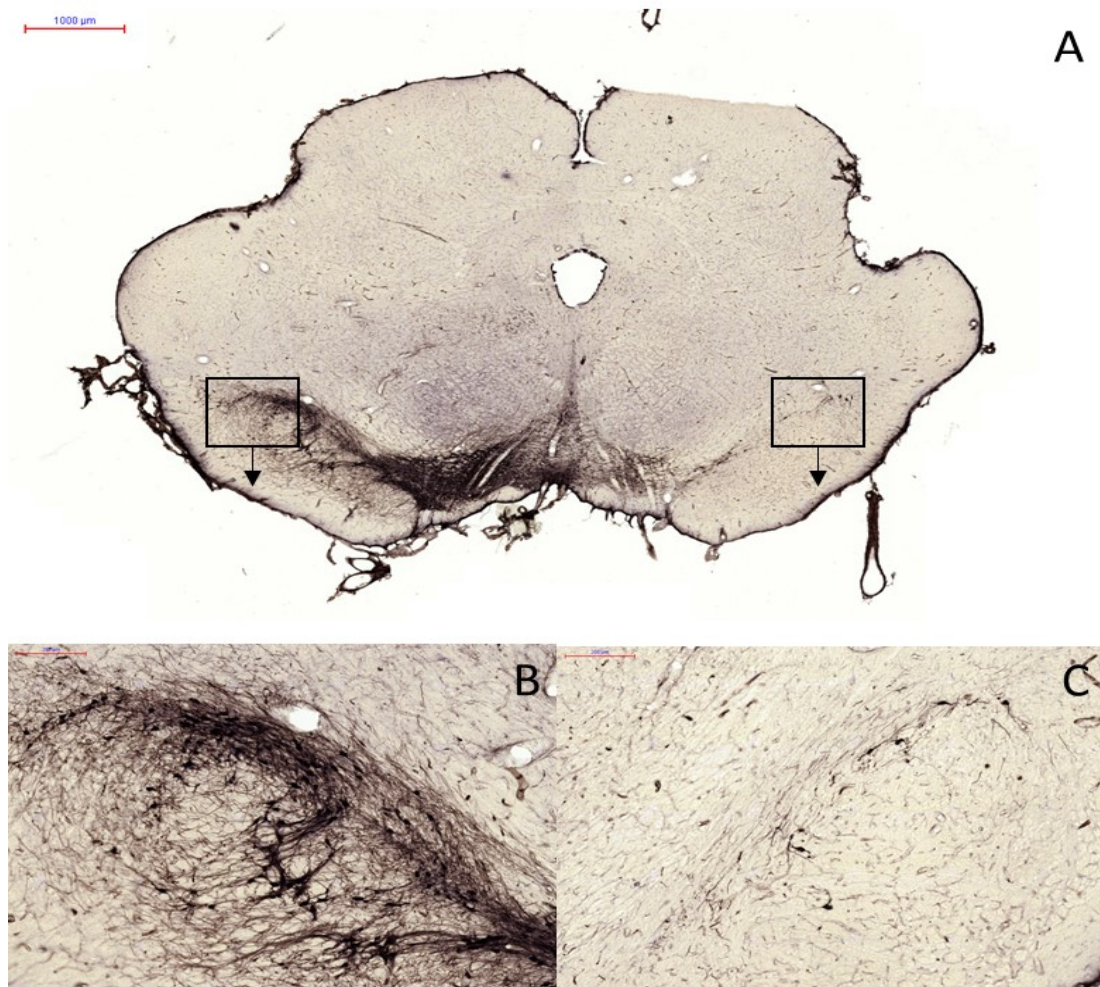


Abbildung 15: Substantia nigra einer unilateral 6-OHDA läsierten Ratte

Dargestellt ist ein TH-gefärbter 30 µm Schnitt auf Höhe der *Substantia nigra* einer 6-OHDA läsierten Ratte. (A) Übersichtsbild mit den *Substantiae nigrae* beider Seiten. Zu sehen ist außerdem der auf der läsierten Seite zu Markierungszwecken angeschnittene Kortex. Der Maßstabsbalken oben links im Bild A entspricht einem Millimeter. Quadratisch markiert sind die lateralen Bereiche der *Substantiae nigrae*, welche in B und C als Ausschnitt dargestellt sind. Die Maßstäbe hier entsprechen jeweils 200 µm. (B) Ausschnittsvergrößerung *Substantia nigra* der läsierten Seite. (C) Ausschnittsvergrößerung *Substantia nigra* der nicht-läsierten Seite.

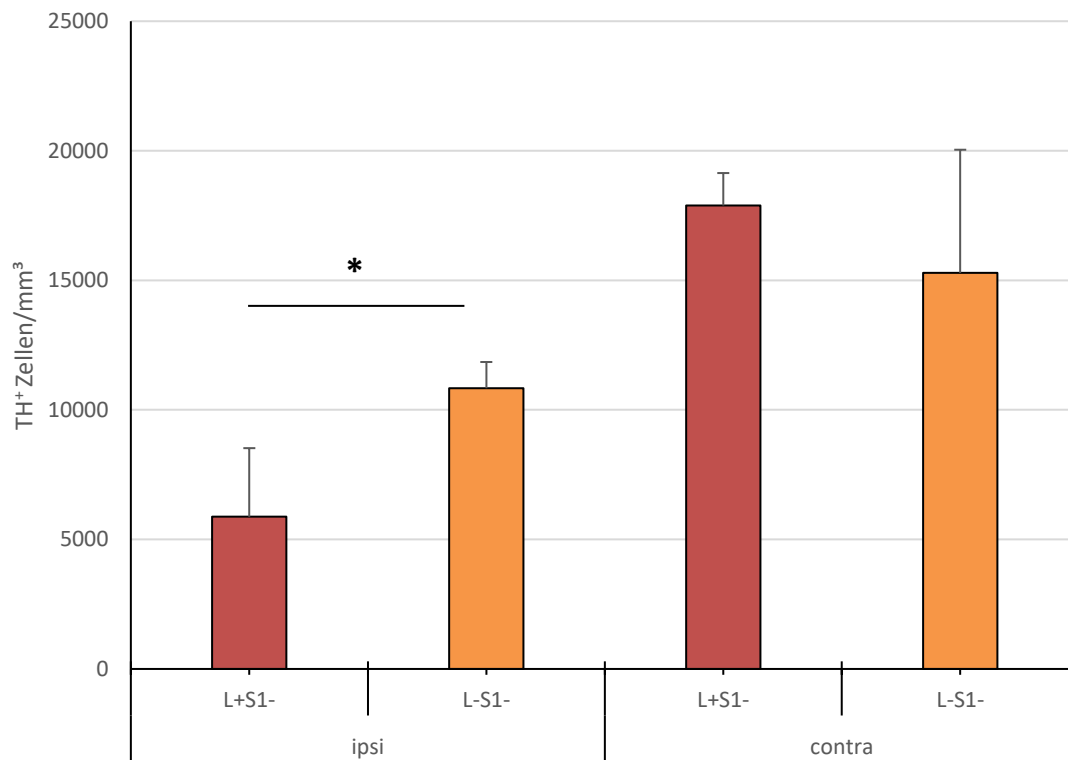


Abbildung 16: Läsionskontrolle Substantia nigra pars compacta

Angegeben ist jeweils die Zahl gezählter TH⁺ Zellen pro mm³ in der SNpc. In der Gruppe L-S1- (naiv) finden sich auf der ipsilateral zur Stimulation gelegenen Hemisphäre signifikant mehr Zellen als in der Gruppe L+S1- (Läsion, Scheinstimulation). Signifikanzen sind bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ mit Sternchen als solche gekennzeichnet und wurden mittels t-Test nach Student ermittelt. Die Fehlerindikatoren kennzeichnen die Standardabweichung vom Mittelwert. Auf der kontralateralen Hemisphäre findet sich kein Unterschied.

3.1.2 Stimulationskontrolle

Um zu sehen, ob die Tiefe Hirnstimulation auch einen Effekt auf die Zelldichte der *Substantia nigra* im gesunden Tier hat, wurden zwei Gruppen ohne 6-OHDA Injektion miteinander verglichen, wobei die eine Gruppe einer 3-wöchigen Tiefen Hirnstimulation unterzogen wurde.

Hierbei zeigten sich (**Abbildung 17**) auf der ipsilateral zur Stimulation gelegenen Hemisphäre signifikant ($p = 0,02$) mehr Zellen in der stimulierten Gruppe gegenüber der nicht-stimulierten Gruppe. Während Tiere der nicht-stimulierten Gruppe im Mittel eine Zelldichte von 10.835 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 452 Zellen/mm³ hatten,

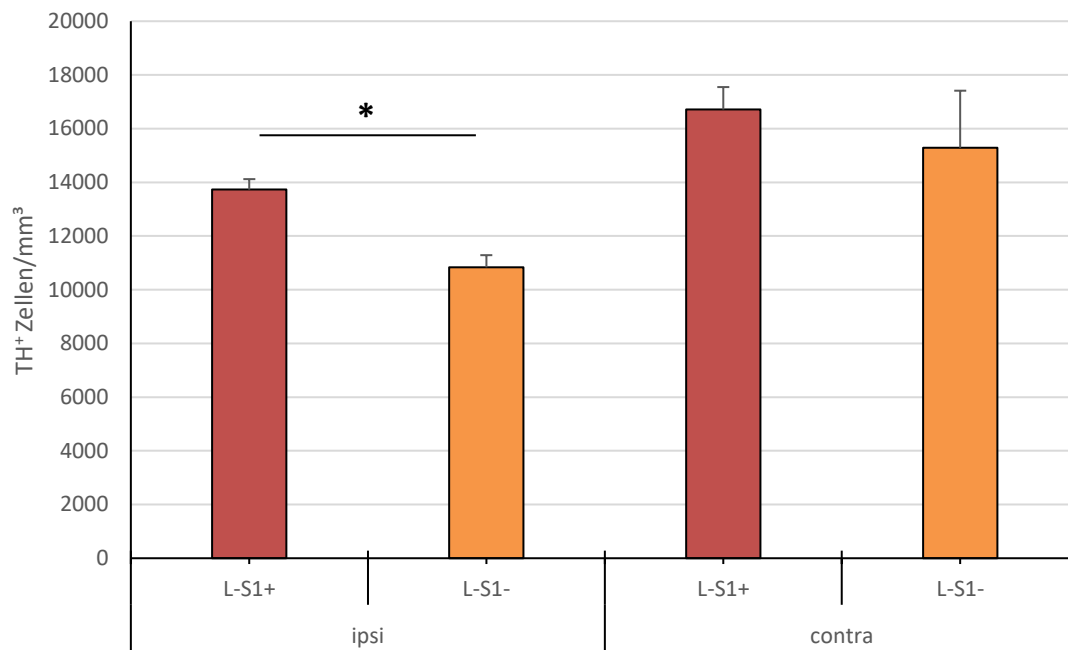


Abbildung 17: Stimulationskontrolle Substantia nigra pars compacta

Angegeben ist jeweils die Zahl gezählter TH⁺ Zellen pro mm³ in der SNpc. Es finden sich signifikant mehr Neurone in der Gruppe L-S1+ (Scheinläsion, 3 Wochen Stimulation) verglichen mit der Gruppe L-S1- (naiv) auf der ipsilateral zur Läsion gelegenen Hemisphäre. Auf der kontralateralen Hemisphäre ergibt sich kein solcher Unterschied. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. * = signifikant ($p \leq 0,05$), ermittelt mittels t-Test nach Student.

fanden sich bei den Tieren der stimulierten Gruppe im Mittel 13.728 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 390 Zellen/mm³.

Auf der zur Stimulation kontralateral gelegenen Seite konnte kein solcher Unterschied gesehen werden. So zeigten sich hier in der naiven Gruppe 15.288 ± 2.125 Zellen/mm³ gegenüber 16.715 ± 833 Zellen/mm³ in der stimulierten Gruppe.

3.1.3 Beobachtungszeitraum 3 Wochen

Die Auswertung der immunhistochemisch gegen Tyrosinhydroxylase gefärbten *Substantia nigra*-Schnitte von über drei Wochen unilateral bipolar stimulierten Tieren ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Als Kontrolle diente hierbei eine zwar ebenfalls 6-OHDA läsionierte, allerdings lediglich schein-stimulierte Gruppe.

Abbildung 18 zeigt, dass sich auf der zur Läsion ipsilateralen Hemisphäre in der nicht stimulierten Gruppe im Mittel 5.874 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 1.324

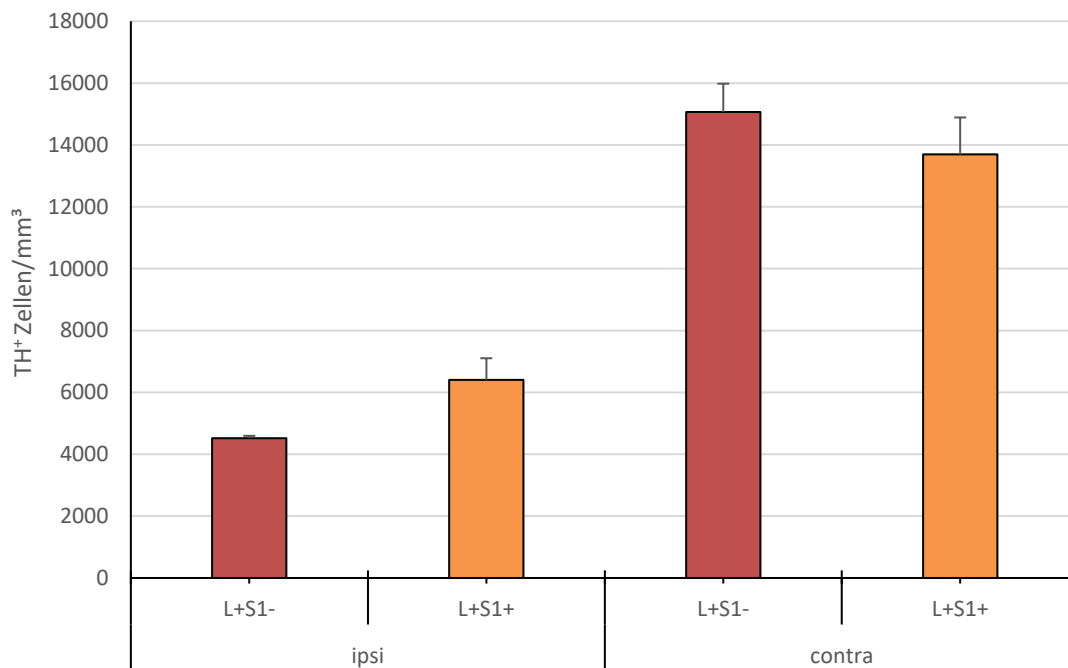


Abbildung 18: Zelldichte in der Substantia nigra pars compacta nach 3-wöchiger Stimulation

Angegeben ist jeweils die Zahl gezählter TH⁺ Zellen pro mm³ in der SNpc. Es zeigt sich weder auf der ipsilateral noch auf der kontralateral zur Stimulation gelegenen Hemisphäre ein signifikanter Unterschied in der Zelldichte zwischen den Gruppen L+S1- (Läsion, Scheinstimulation) und L+S1+ (Läsion, bipolare Stimulation über 3 Wochen). Ermittelt mittels t-Test nach Student. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

Zellen/mm³ finden gegenüber im Mittel 5.735 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 2.035 Zellen/mm³ bei den über 3 Wochen stimulierten Tieren. Demgegenüber zeigten sich auf der zur Läsion kontralateralen Hemisphäre im Mittel 17.890 ± 625 Zellen/mm³ bei den nicht-stimulierten Tieren und 16.277 ± 901 Zellen/mm³ bei den stimulierten Tieren.

3.1.4 Beobachtungszeitraum 6 Wochen

In der stereologischen Auswertung der gegen TH gefärbten Neurone der *Substantia nigra* von unilateral, unipolar über 6 Wochen stimulierten sowie unipolar, unilateral über 3 Wochen stimulierten und über weitere 3 Wochen weiter beobachteten Tieren

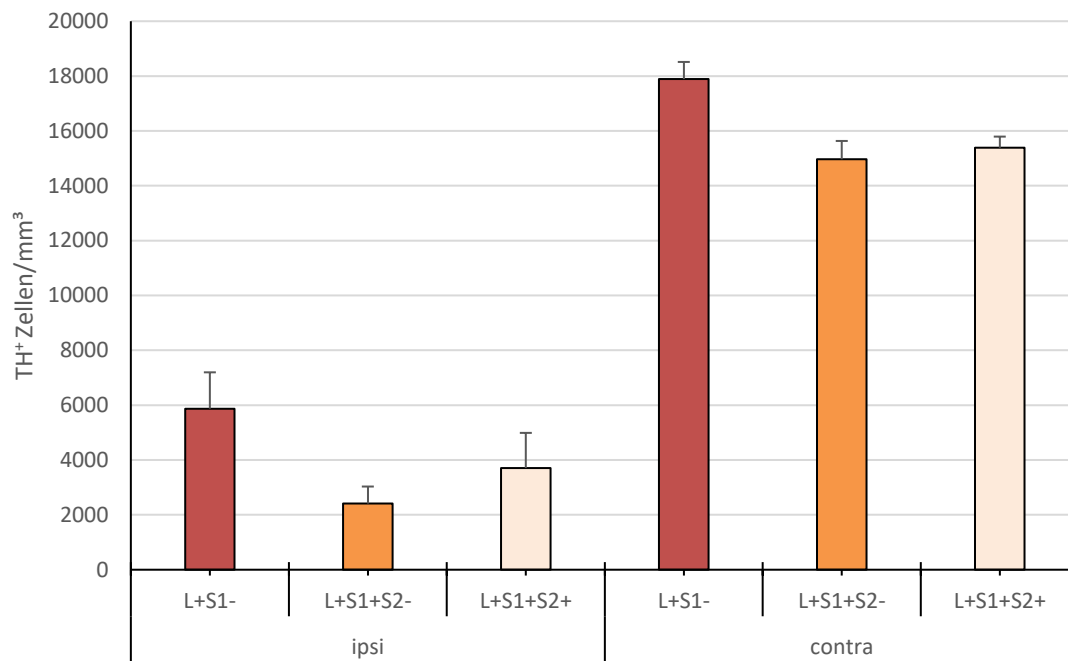


Abbildung 19: Zelldichte Substantia nigra pars compacta nach 6-wöchiger Stimulation

Angegeben ist jeweils die Zahl gezählter TH⁺ Zellen pro mm³ in der SNpc. Es findet sich weder auf der ipsilateral noch auf der kontralateral zur Stimulation gelegenen Hemisphäre ein signifikanter Unterschied in der Zelldichte zwischen den Gruppen, ermittelt mittels einfaktorieller ANOVA. Verglichen wurden die Gruppen L+S1+S2- (Läsion, 3 Wochen Stimulation, 3 Wochen Stimulator aus) sowie L+S1+S2+ (Läsion, 6 Wochen Stimulation) jeweils mit der Gruppe L+S1- (Läsion, Scheinstimulation). Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Als Kontrollgruppe diente hier ebenfalls die Gruppe ohne Stimulation allerdings mit erfolgter 6-OHDA Läsion. Diese Gruppen sind in **Abbildung 19** gegenübergestellt. In der über 6 Wochen durchgehend stimulierten Gruppe fanden sich auf der ipsilateral zur Stimulation gelegenen Seite im Mittel 3.706 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 1282 Zellen/mm³. In der über 3 Wochen durchgehend stimulierten und anschließend über 3 Wochen weiter beobachteten Gruppe fanden sich im Mittel 2.413 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 619 Zellen/mm³. In der Kontrollgruppe ergaben sich dagegen 5.874 ± 1324 Zellen/mm³. Auf der zur Stimulation kontralateral gelegenen Seite fanden sich in der 6 Wochen stimulierten Gruppe im Mittel 15.388 ± 405 Zellen/mm³ gegenüber 14.967 ± 666 Zellen/mm³ in der nur 3 Wochen durchgehend stimulierten Gruppe und 17.890 ± 625 Zellen/mm³ in der Kontrollgruppe.

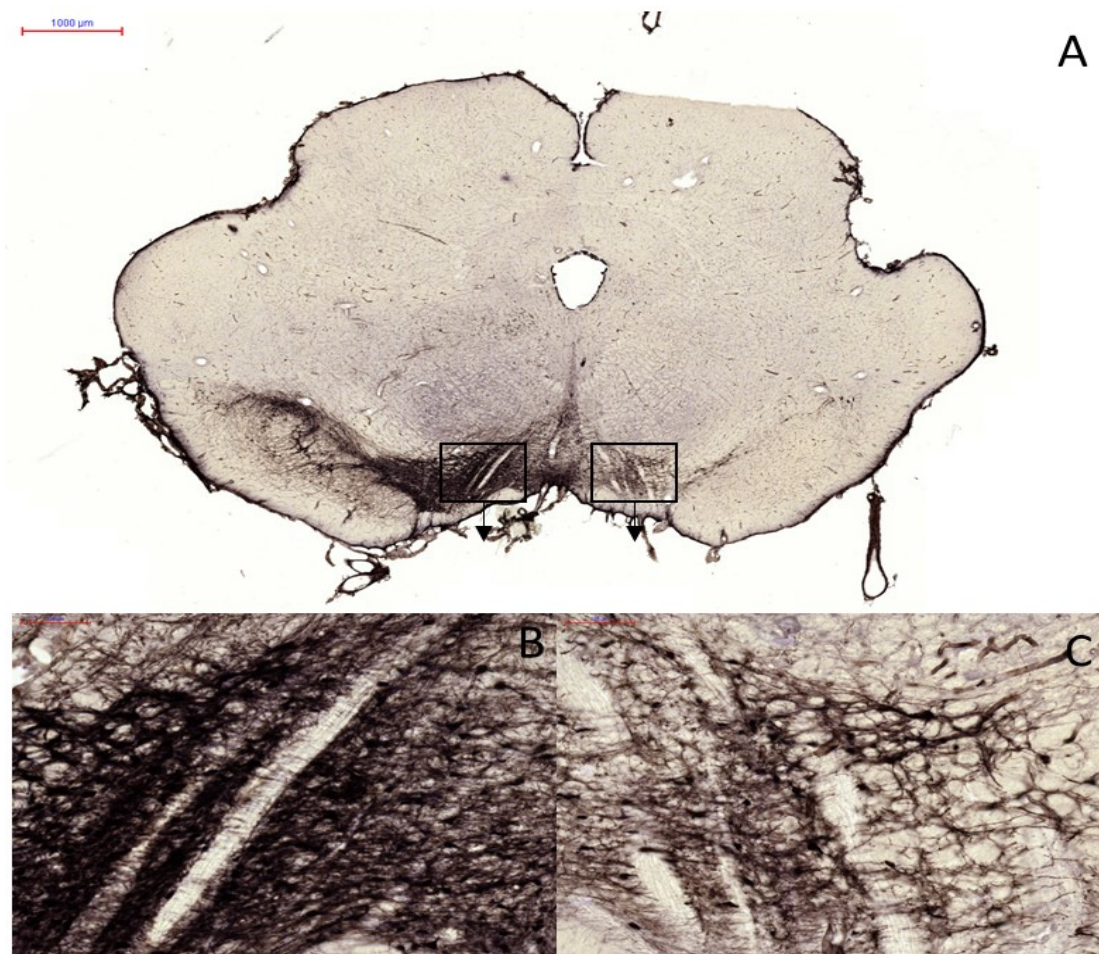


Abbildung 20: Area tegmentalis ventralis einer unilateral 6-OHDA läsionierten Ratte
Dargestellt ist ein TH gefärbter 30 µm Schnitt auf Höhe der VTA einer 6-OHDA läsionierten Ratte. (A) Übersichtsbild mit den VTA beider Seiten. Zu sehen ist außerdem der auf der läsionierten Seite zu Markierungszwecken angeschnittene Kortex. Der Maßstabsbalken oben links im Bild entspricht einem Millimeter. Quadratisch markiert sind die mittigen Bereiche der VTA, welche in B und C als Ausschnitt dargestellt sind. (B) Ausschnittsvergrößerung VTA der läsionierten Seite. (C) Ausschnittsvergrößerung VTA der nicht-läsionierten Seite. Die Maßstabsbalken in B und C entsprechen 200 µm.

3.2 Area tegmentalis ventralis

3.2.1 Läsionskontrolle

Um die Effektivität der 6-OHDA Läsion auf zellulärer Ebene in der *Area tegmentalis ventralis* zu zeigen, wurden analog zur *Substantia nigra* zwei nicht- bzw. schein-stimulierte Gruppen miteinander verglichen, wobei die Tiere der einen Gruppe eine 6-OHDA

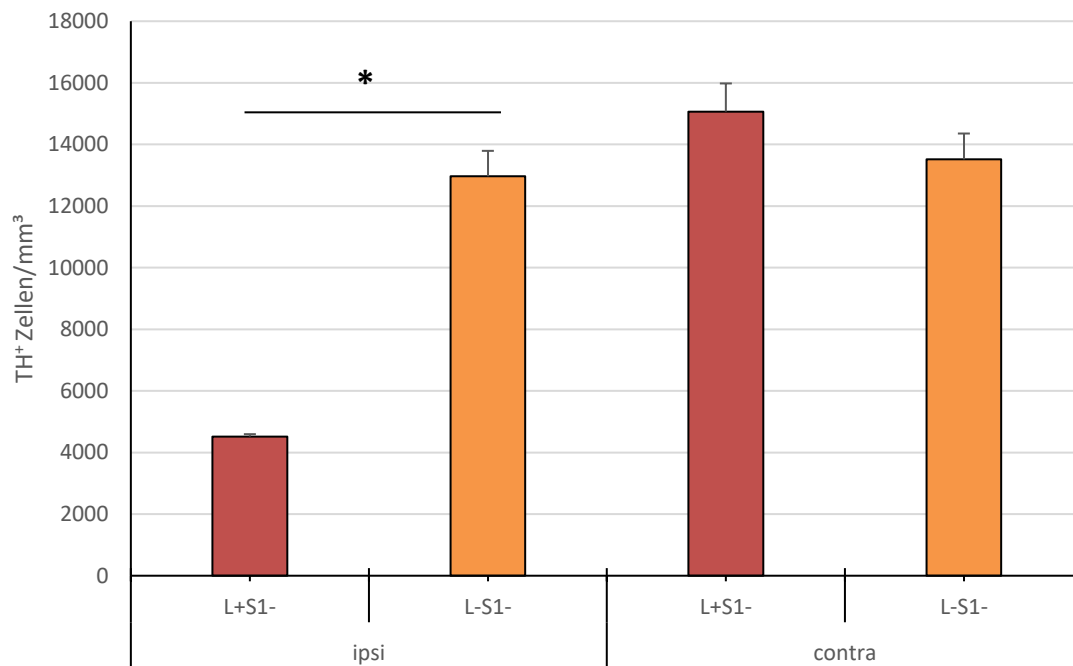


Abbildung 21: Läsionskontrolle Area tegmentalis ventralis

Angegeben ist jeweils die Zahl gezählter TH⁺ Zellen pro mm³ in der VTA. Hierbei finden sich auf der ipsilateral zur Läsion gelegenen Hemisphäre signifikant mehr Zellen in der Gruppe L-S1- (naiv) verglichen mit der Gruppe L+S1- (Läsion, Scheinstimulation). Auf der kontralateralen Hemisphäre findet sich kein solcher Unterschied. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. * = signifikant ($p \leq 0,05$), verglichen mittels t-Test nach Student

induzierte Läsion des medialen Vorderhirnbündels erhielten, die der anderen Gruppe nicht.

Es fanden sich hierbei signifikant ($p = 0,000042$) mehr Zellen in der naiven Gruppe im Vergleich zur läsierten, wie **Abbildung 21** eindrücklich zeigt. Die läsierten Tiere hatten im Mittel eine Zelldichte von 4.519 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 76 Zellen/mm³ gegenüber im Mittel 12.968 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 824 Zellen/mm³ bei den Tieren ohne Läsion. Auch hier konnte also der Erfolg der Läsion auf zellulärer Ebene gesehen werden. In der zur Läsion kontralateralen Hemisphäre zeigte sich kein solcher Unterschied. So ergaben sich hier Zellzahlen von 15.067 ± 913 Zellen/mm³ für die Läsionsgruppe im Vergleich zu 13.517 ± 838 Zellen/mm³ in der naiven Gruppe. **Abbildung 20** zeigt exemplarisch einen 30 µm-Schnitt auf Höhe der VTA eines 6-OHDA läsierten Tieres.

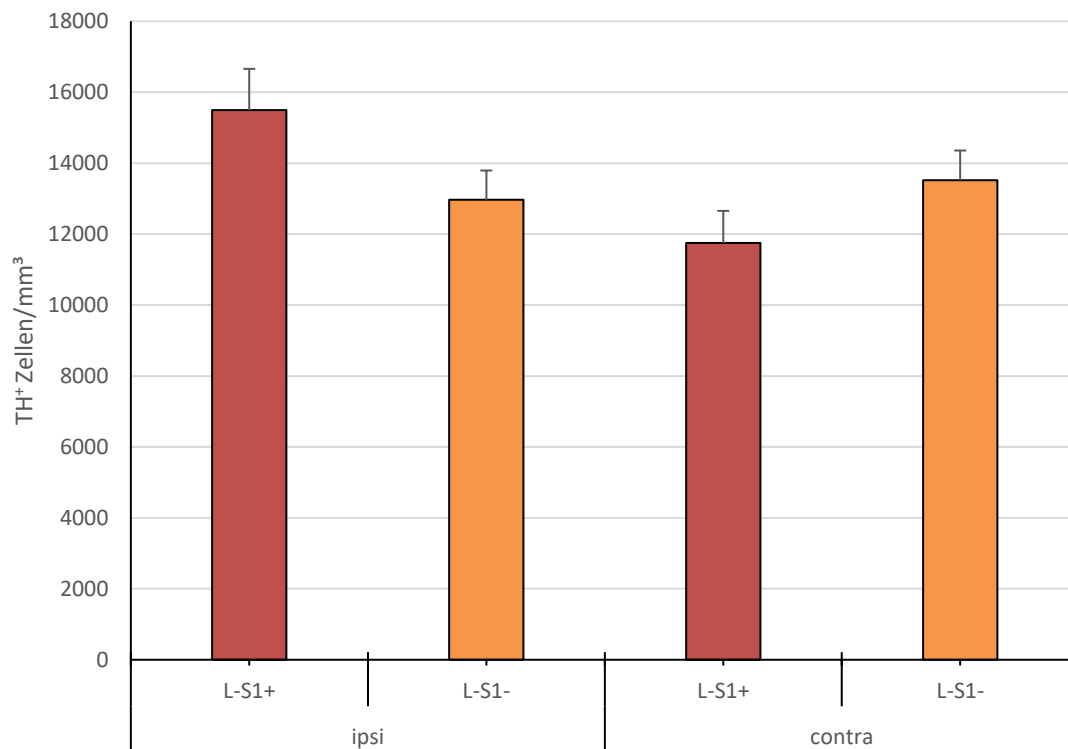


Abbildung 22: Stimulationskontrolle Area tegmentalis ventralis

Angegeben ist jeweils die Zahl gezählter TH⁺ Zellen pro mm³ in der VTA. Es findet sich kein signifikanter Unterschied in der Zelldichte zwischen den Gruppen, weder auf der ipsilateral noch auf der kontralateral zur Stimulation gelegenen Hemisphäre. Verglichen wurde immer die Gruppe L-S1+ (Keine Läsion, Stimulation) mit der Gruppe L-S1- (naiv). Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. Verglichen wurde mittels t-Test nach Student.

3.2.2 Stimulationskontrolle

Um zu untersuchen, ob die Tiefe Hirnstimulation auch einen Effekt auf die Zelldichte der *Area tegmentalis ventralis* im gesunden Tier hat, wurden wieder zwei Gruppen ohne 6-OHDA Injektion miteinander verglichen, wobei die eine Gruppe einer 3-wöchigen Tiefen Hirnstimulation unterzogen wurde. Wie in **Abbildung 22** dargestellt fanden sich zwischen keiner der Gruppen signifikante Unterschiede. Auf der zur Stimulation ipsilateralen Hemisphäre wurde die mittlere Zelldichte mit 15.500 Zellen/mm³ und einem Standardfehler von 1.158 Zellen/mm³ in der Stimulationsgruppe gezählt. Demgegenüber standen 12.968 Zellen/mm³ und ein Standardfehler von 824 Zellen/mm³ in der Gruppe ohne Stimulation. Auf der zur Stimulation kontralateralen Hemisphäre zeigten sich

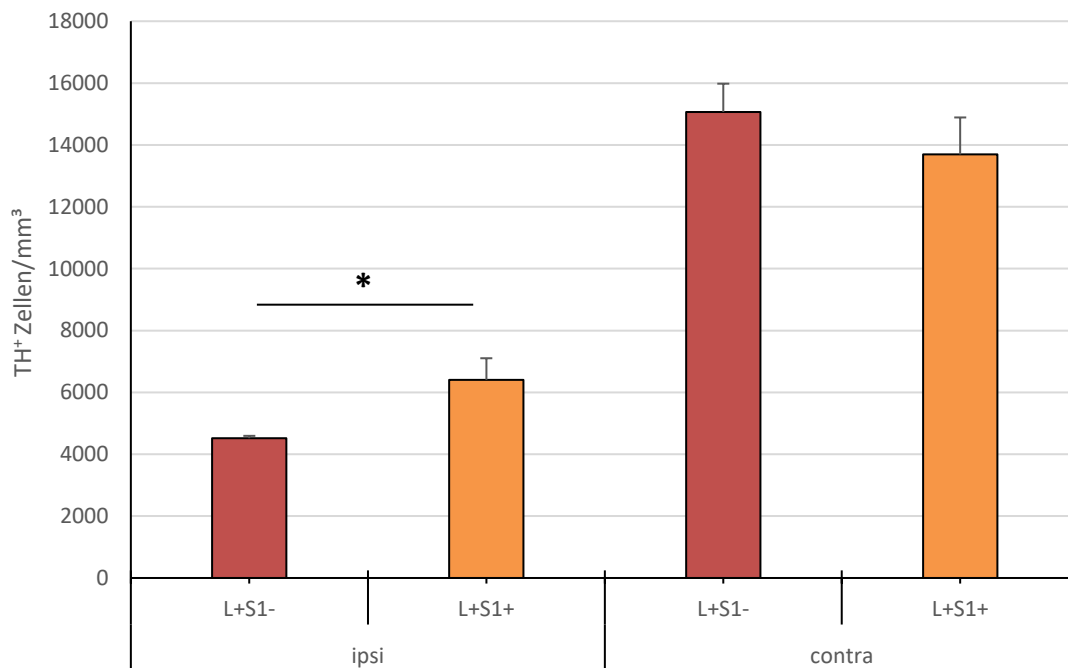


Abbildung 23: Zelldichte Area tegmentalis ventralis nach 3-wöchiger Stimulation

Angegeben ist jeweils die Zahl gezählter TH⁺ Zellen pro mm³ in der VTA. Es finden sich signifikant weniger Zellen auf der ipsilateral zur Stimulation gelegenen Hemisphäre in der Gruppe L+S1- (Läsion, Scheinstimulation) verglichen mit der Gruppe L+S1+ (Läsion, 3-wöchige bipolare Stimulation). Auf der kontralateralen Hemisphäre findet sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. * = signifikant ($p \leq 0,05$), verglichen mittels t-Test nach Student.

11.748 ± 906 Zellen/mm³ bei den stimulierten Tieren und 13.517 ± 838 Zellen/mm³ bei den nicht stimulierten Tieren. Kontralateralen Hemisphäre zeigten sich 11.748 ± 906 Zellen/mm³ bei den stimulierten Tieren und 13.517 ± 838 Zellen/mm³ bei den nicht stimulierten Tieren.

3.2.3 Beobachtungszeitraum 3 Wochen

Die Auswertung der immunhistochemisch gegen Tyrosinhydroxylase gefärbten *Area tegmentalis ventralis* Schnitte von über 3 Wochen unilateral bipolar stimulierten Tieren ergab eine signifikant ($p = 0,024$) höhere Zelldichte in der über 3 Wochen bipolar stimulierten Gruppe gegenüber der lediglich scheinstimulierten. Als Kontrolle diente hierbei eine zwar ebenfalls 6-OHDA läionierte, allerdings lediglich schein-stimulierte Gruppe.

Abbildung 23 stellt diesen Unterschied dar. Auf der ipsilateral zur Stimulation gelegenen

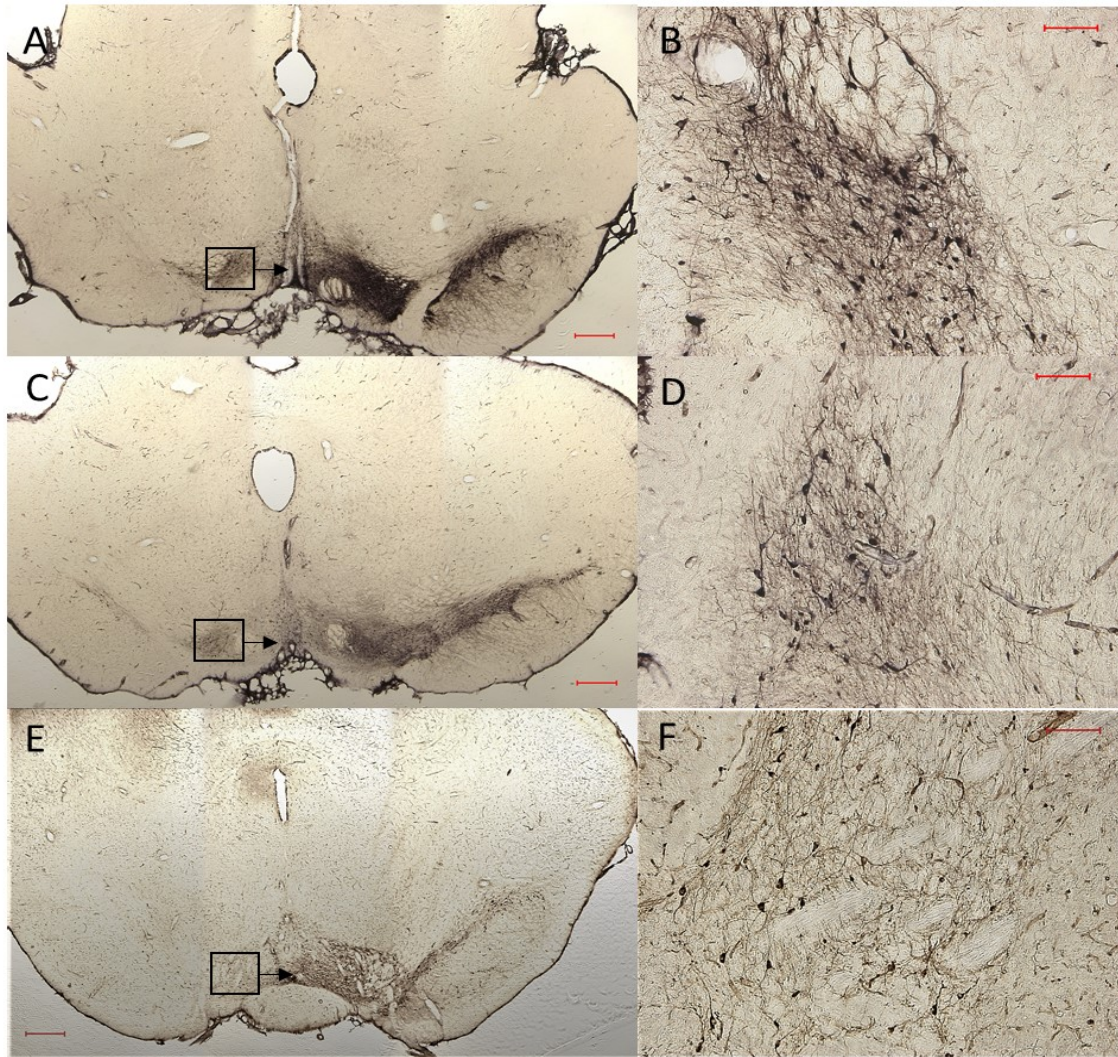


Abbildung 24: Hirnschnitte nach 6-wöchiger Stimulation

Dargestellt sind TH-gefärbte Hirnschnitte der sechs Wochen Gruppen sowie der Kontrollgruppe. Bereits makroskopisch zu erkennen ist die geringere Zelldichte der Kontrollgruppe im Vergleich zu den stimulierten Gruppen. (A) Schnitt aus der Gruppe L+S1+S2+. Der quadratisch umrandete Ausschnitt ist in B dargestellt. (B) Ausschnitt aus A in 20-facher Vergrößerung. Man erkennt die TH⁺ Zellgruppen (C) Schnitt aus der Gruppe L+S1+S2-. Der quadratisch umrandete Ausschnitt ist in D dargestellt. (D) Ausschnitt aus C in 20-facher Vergrößerung. (E) Schnitt aus der Kontrollgruppe L+S1-. Der quadratisch umrandete Ausschnitt ist in F dargestellt. (F) Ausschnitt aus E in 20-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken in den Abbildungen A, C, E entspricht 1 mm, der in den Abbildungen B, D, F entspricht 200 µm.

Hemisphäre fanden sich mit im Mittel 6.404 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 699 Zellen/mm³ in der über 3 Wochen stimulierten Gruppe signifikant mehr TH⁺ Zellen als in der Kontrollgruppe. Hier waren es lediglich im Mittel 4.519 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 76 Zellen/mm³. Auf der kontralateral zur Stimulation

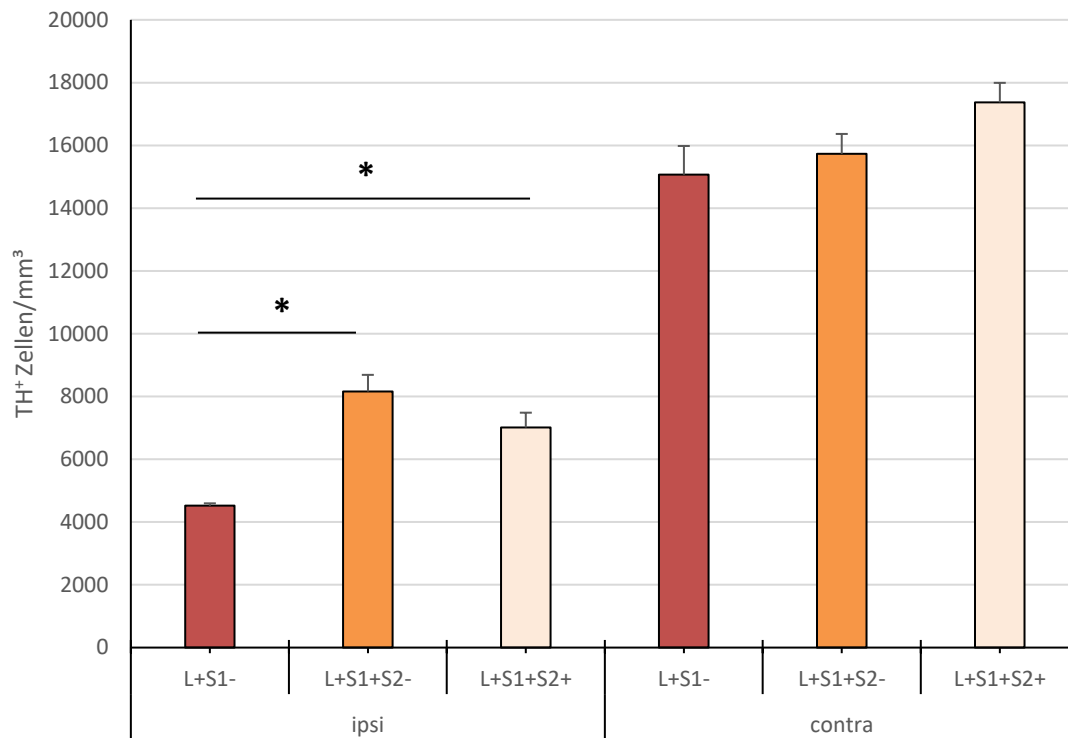


Abbildung 25: Zelldichte Area tegmentalis ventralis nach 6-wöchiger Stimulation

Angegeben ist jeweils die Zahl gezählter TH⁺ Zellen pro mm³ in der VTA. Es zeigt sich eine signifikant höhere Zelldichte auf der ipsilateral zur Stimulation gelegenen Hemisphäre sowohl in der Gruppe L+S1+S2- (Läsion, 3 Wochen Stimulation, 3 Wochen abgeschaltete Stimulation) als auch in der Gruppe L+S1+S2+ (Läsion, 6 Wochen Stimulation) jeweils gegenüber der Kontrollgruppe L+S1- (Läsion, keine Stimulation). Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. * = signifikant ($p \leq 0,05$), gemessen mittels einfaktorieller ANOVA

gelegenen Hemisphäre ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei im Mittel 15.067 ± 913 Zellen/mm³ in der Kontrollgruppe gegenüber 13.695 ± 1.193 Zellen/mm³ in der Stimulationsgruppe.

3.2.4 Beobachtungszeitraum 6 Wochen

Im Block der 6 Wochen beobachteten Tiere fanden sich signifikant mehr TH⁺ Zellen in der *Area tegmentalis ventralis* sowohl von 6 Wochen durchgehend unilateral unipolar stimulierten Tieren ($p = 0,008$) als auch bei Stimulation von 3 Wochen unipolar unilateral mit anschließendem Abschalten des Stimulators und Beobachtung über 3 weitere Wochen ($p = 0,00044$). Jeweils auf der ipsilateral zur Stimulation gelegenen Hemisphäre und



Abbildung 26: Locus coeruleus einer unilateral 6-OHDA läsierten Ratte

Dargestellt ist ein TH gefärbter 30µm Schnitt auf Höhe des LC einer 6-OHDA läsierten Ratte. (A) Übersichtsbild mit den LC beider Seiten. Der Maßstabsbalken oben links im Bild entspricht zwei Millimeter. Quadratisch markiert sind die vorderen Bereiche des LC, welche in B und C als Ausschnitt dargestellt sind. (B) Ausschnittsvergrößerung LC der läsierten Seite. (C) Ausschnittsvergrößerung LC der nicht-läsierten Seite.

gegenüber der Kontrolle mit lediglich Scheinstimulation. Dieser Effekt ist konsistent zu den nach 3 Wochen gefundenen Veränderungen aus **Abbildung 23**.

In der Gruppe mit 6 Wochen durchgehender Stimulation fanden sich nach Auswertung auf der ipsilateral zur Stimulation gelegenen Hemisphäre im Mittel 7.013 TH⁺ Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 470 Zellen/mm³. In der lediglich 3 Wochen stimulierten Gruppe zeigten sich dagegen 8.159 Zellen/mm³ mit einem Standardfehler von 529 Zellen/mm³ gegenüber lediglich 4.519 ± 76 Zellen/mm³ in der Kontrollgruppe. Auf

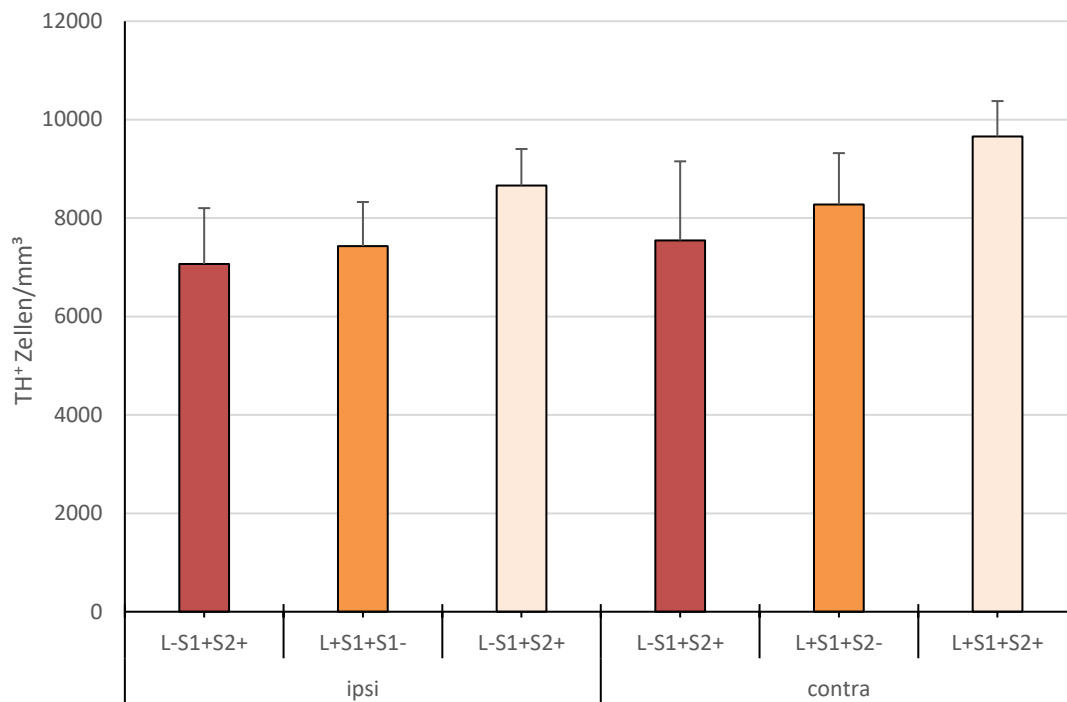


Abbildung 27: Zelldichte Locus coeruleus nach 6-wöchiger Stimulation

Angegeben ist jeweils die Zahl gezählter TH⁺ Zellen pro mm³ im LC. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen weder auf der ipsilateral noch auf der kontralateral zur Stimulation gelegenen Hemisphäre. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

der kontralateral zur Stimulation gelegenen Seite konnte kein solcher Unterschied gefunden werden. Dies zeigt sich in einer mittleren Zellzahl von 17.371 ± 621 Zellen/mm³ in der 6 Wochen durchgängig stimulierten Gruppe gegenüber 15.732 ± 632 Zellen/mm³ in der lediglich 3 Wochen durchgängig stimulierten Gruppe im Vergleich zu 15.067 ± 913 Zellen/mm³ in der Kontrollgruppe (**Abbildung 25**).

3.3 Locus coeruleus

Bei der Auswertung des *Locus coeruleus* wurden aus technischen Gründen nur die 6-Wochen beobachteten Gruppen ausgewertet. Hierbei stand leider keine Kontrollgruppe mit Läsion aber ohne Stimulation zur Verfügung, sodass lediglich die Gruppe L-S1+S2+ (keine Läsion aber 6-wöchige Stimulation) als Kontrolle betrachtet werden konnte. In

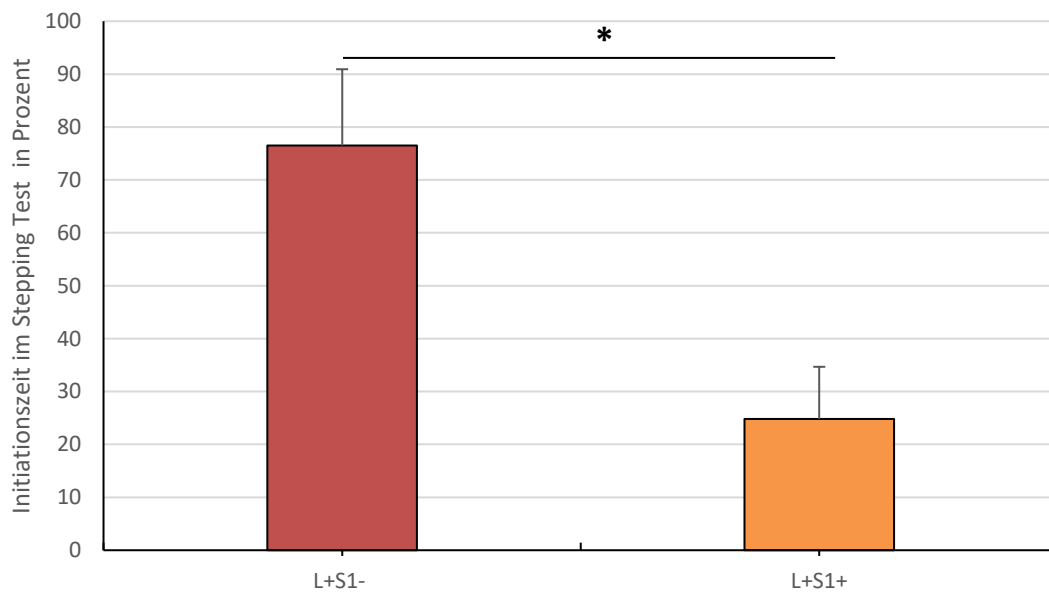


Abbildung 28: Initiationszeit im Stepping-Test nach 3 Wochen Stimulation

Angegeben ist die Initiationszeit der Vorderpfote im ST in Prozent nach gegenüber vor der 3-wöchigen Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe L+S1+ gegenüber der Kontrollgruppe L+S1-. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. * = signifikant ($p \leq 0,05$), gemessen mittels Student-t-Test.

diesem Block konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden, wie in **Abbildung 27** dargestellt.

Auf der ipsilateral zur Stimulation gelegenen Seite fanden sich in der über 6 Wochen kontinuierlich stimulierten Gruppe im Mittel $8.661 \text{ TH}^+ \text{ Zellen/mm}^3$ mit einem Standardfehler von 742 Zellen/mm^3 . Während in der lediglich über 3 Wochen kontinuierlich stimulierten Gruppe im Mittel $7.430 \text{ Zellen/mm}^3$ mit einem Standardfehler von 896 Zellen/mm^3 gesehen wurden. Demgegenüber stehen $7.066 \text{ Zellen/mm}^3$ mit einem Standardfehler von $1.135 \text{ Zellen/mm}^3$ in der Kontrollgruppe.

Auf der kontralateral zur Stimulation gelegenen Seite zeigten sich in der über 6 Wochen kontinuierlich stimulierten Gruppe im Mittel $9.658 \pm 719 \text{ TH}^+ \text{ Zellen/mm}^3$ gegen $8.276 \pm 1.044 \text{ Zellen/mm}^3$ in der lediglich über 3 Wochen stimulierten Gruppe im Vergleich zu $7.545 \pm 1.607 \text{ Zellen/mm}^3$ in der Kontrollgruppe. Da der *Locus coeruleus* im Gegensatz

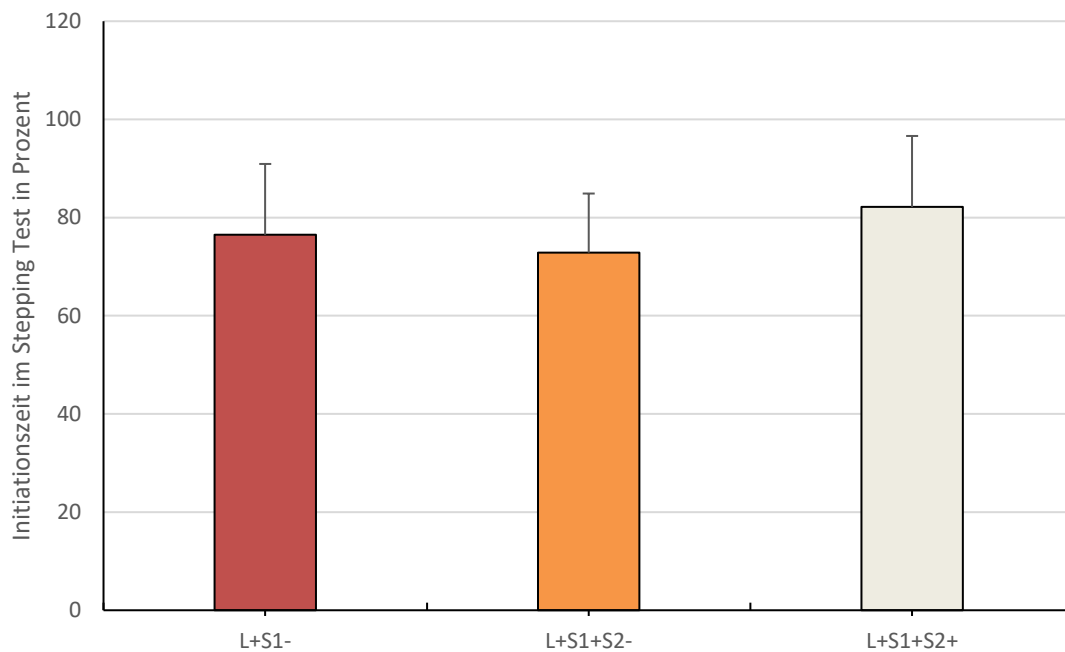


Abbildung 29: Initiationszeit im Stepping-Test nach 6 Wochen Stimulation

Angegeben ist die Initiationszeit im ST in Prozent nach gegenüber vor der 6-wöchigen Stimulation. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. * = signifikant ($p \leq 0,05$), gemessen mittels einfaktorieller ANOVA

zu den anderen betrachteten Regionen nicht von der 6-OHDA-induzierten Läsion betroffen ist, finden sich hier auch keine Unterschiede zwischen linker und rechter Hemisphäre. Dies ist noch einmal anhand eines Hirnschnittes in **Abbildung 26** verdeutlicht.

3.4 Verhaltenstests

Für die Durchführung und Bereitstellung der Daten zu den Verhaltenstests möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Kathrin Badstübner-Meeske bedanken. Hierbei diente der Stepping-Test (ST) dazu, Veränderungen in der Motorik zu zeigen, während der Open-Field-Test (OFT) dazu genutzt wurde das Ängstlichkeitsverhalten der Tiere darzustellen. Im ST entspricht eine kurze Initiationszeit einer guten Motorik bzw. geringen Akinese. Im OFT entspricht dagegen eine größere zurückgelegte Wegstrecke einem geringer ausgeprägten Ängstlichkeitsverhalten.

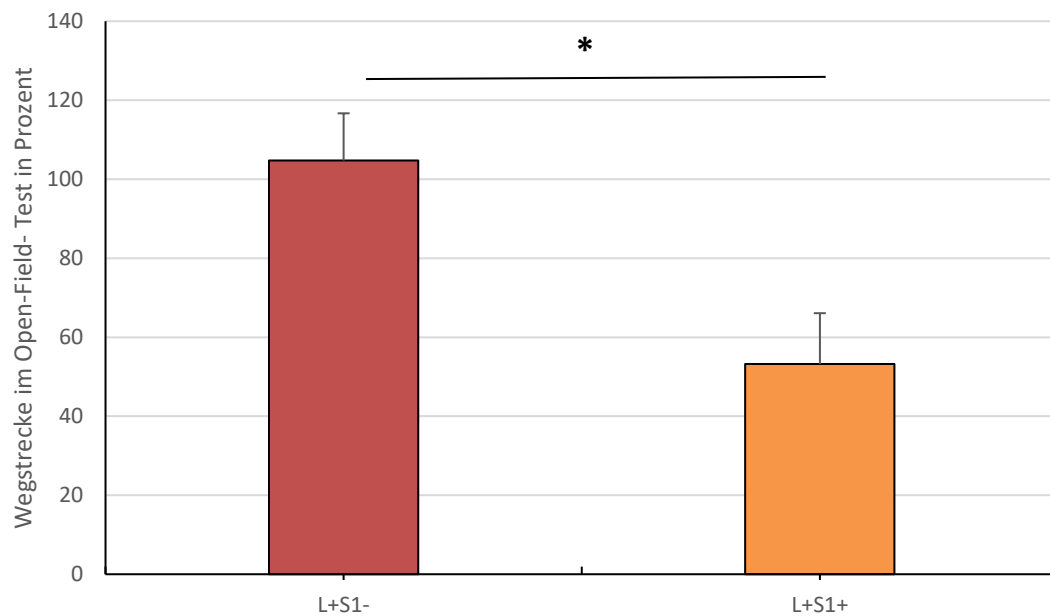


Abbildung 30: Zurückgelegte Wegstrecke im Open-Field-Test nach 3 Wochen Stimulation

Angegeben ist jeweils die zurückgelegte Wegstrecke im OFT in Prozent der Strecke nach gegenüber vor der 3-wöchigen Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Stimulationsgruppe L+S1+ verglichen mit der Kontrollgruppe L+S1-. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. * = signifikant ($p \leq 0,05$), gemessen mittels Student-t-Test.

Die Verhaltenstests wurden immer zu den Zeitpunkten „Prä-Läsion“, „Post-Läsion“ und „Post-Stimulation“ durchgeführt. Um einen Effekt durch die Tiefe Hirnstimulation sichtbar zu machen wurden aus den Variablen Post-Läsion und Post-Stimulation Quotienten gebildet und diese in Prozent angegeben. Ein Wert von 100% bedeutet also, dass keine Veränderung zwischen den Werten vor und nach der Stimulation besteht. Verglichen wurden hier nur noch die läsierten und über mehrere Wochen stimulierten Gruppen immer jeweils mit der Kontrollgruppe mit Läsion aber ohne Stimulation.

3.4.1 Stepping-Test

Wie in **Abbildung 28** dargestellt, findet sich nach 3-wöchiger (bipolarer) Stimulation im ST eine signifikant ($p = 0,041$) niedrigere Initiationszeit bei den Tieren in der Stimulationsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

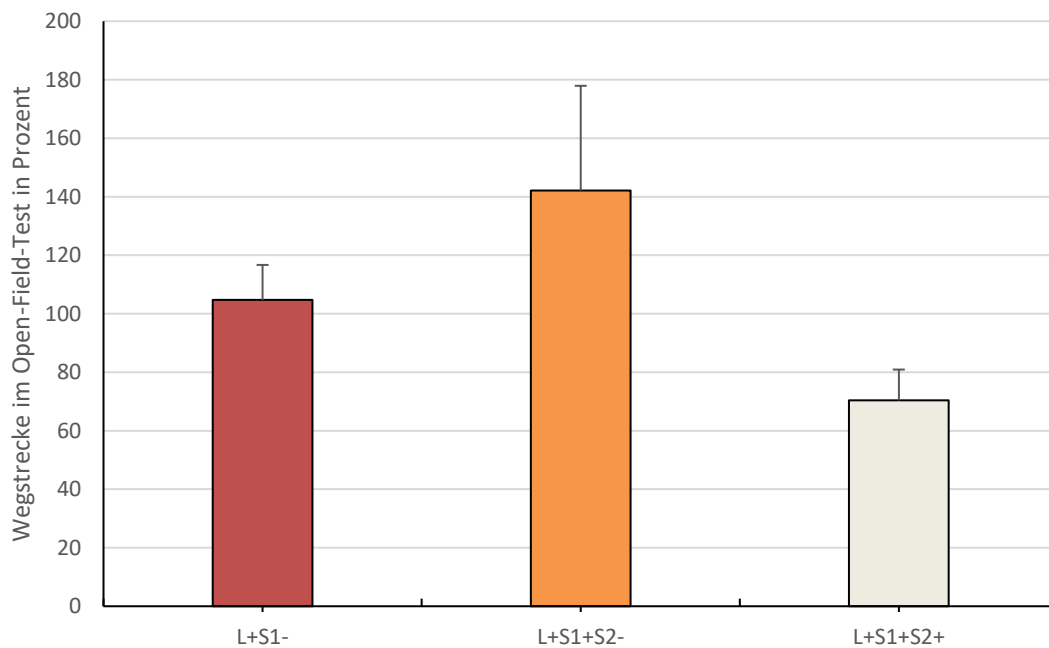


Abbildung 31: Zurückgelegte Wegstrecke im Open-Field-Test nach 6 Wochen Stimulation

Angegeben ist die jeweils die zurückgelegte Wegstrecke im OFT in Prozent der Strecke nach gegenüber vor der 6-wöchigen Stimulation. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. * = signifikant ($p \leq 0,05$), gemessen mittels einfaktorieller ANOVA.

Während die Tiere der Kontrollgruppe mit im Mittel 77 ± 14 % eine im Vergleich zu vor der Stimulation kaum veränderte Initiationszeit aufwiesen, war diese in der Stimulationsgruppe mit im Mittel 25 ± 9 % deutlich vermindert, was auf eine verbesserte motorische Funktion hindeutet. Die nach 3 Wochen gezeigte Verbesserung der motorischen Funktion im ST konnte nach 6 Wochen nicht mehr nachgewiesen werden. Hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen den beiden Stimulationsgruppen mit der Kontrollgruppe (**Abbildung 29**). In der 6 Wochen durchgehend stimulierten Gruppe hatten die Tiere mit im Mittel 82 ± 14 % Initiationszeit eine fast unveränderte Initiationszeit im Vergleich zu vor der Stimulation. Ein ähnliches Ergebnis fand sich in der Gruppe L+S1+S2-, wobei die Initiationszeit im Mittel 73 ± 12 % betrug und sich damit ebenfalls auf einem Niveau vor und nach der Stimulation befindet.

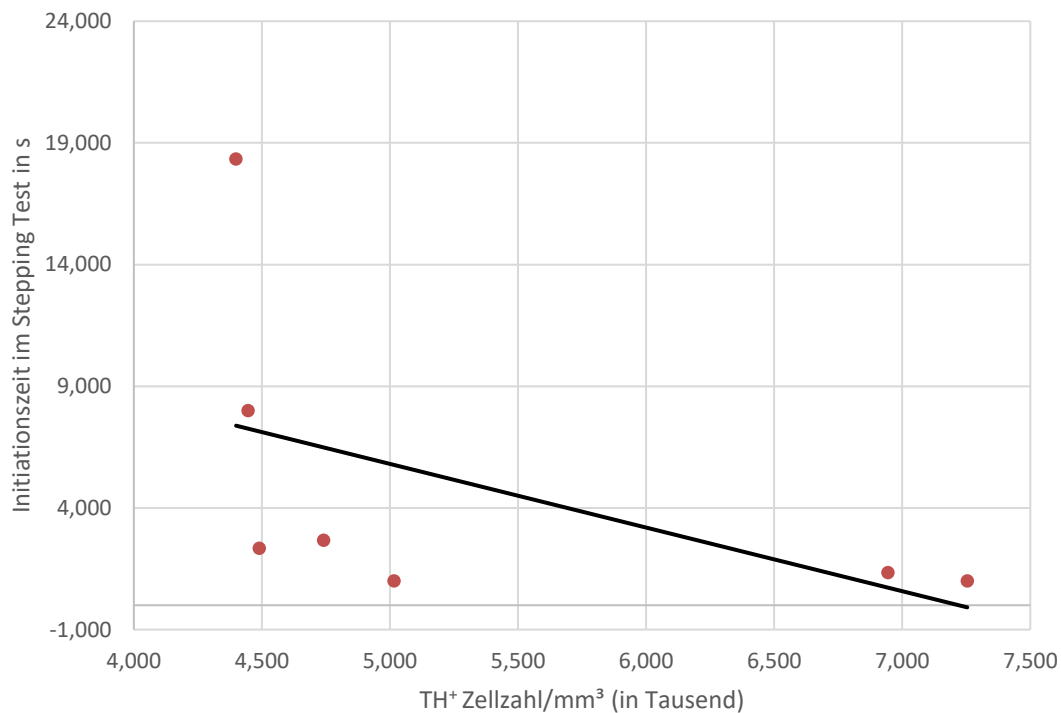


Abbildung 32: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Area tegmentalis ventralis nach 3 Wochen Stimulation mit der Initiationszeit im Stepping-Test

Dargestellt ist die Zellzahl/mm³ in Tausend in der ipsilateral zur Stimulation gelegenen VTA gegenüber der Initiationszeit in Sekunden im ST nach 3 Wochen. Es zeigt sich eine negative Korrelation mit einem Koeffizienten nach Pearson von -0,504. Zu beachten ist ein Ausreißer von 18,33s Initiationszeit.

3.4.2 Open-Field-Test

Betrachtet man die zurückgelegte Wegstrecke im Open-Field-Test im Vergleich vor und nach der Stimulation so findet sich nach 3-wöchiger THS eine signifikant ($p = 0,034$) niedrigere zurückgelegte Wegstrecke als in der Kontrollgruppe.

Während die Tiere in der Kontrollgruppe mit im Mittel $105 \pm 12 \%$ eine ähnliche zurückgelegte Wegstrecke vor und nach Stimulation aufwiesen, zeigte sich in der Stimulationsgruppe mit im Mittel $53 \pm 13 \%$ eine deutlich verminderte Aktivität im OFT.

Führt man denselben Vergleich nach 6 Wochen durch, verschwindet dieser Effekt wieder und es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

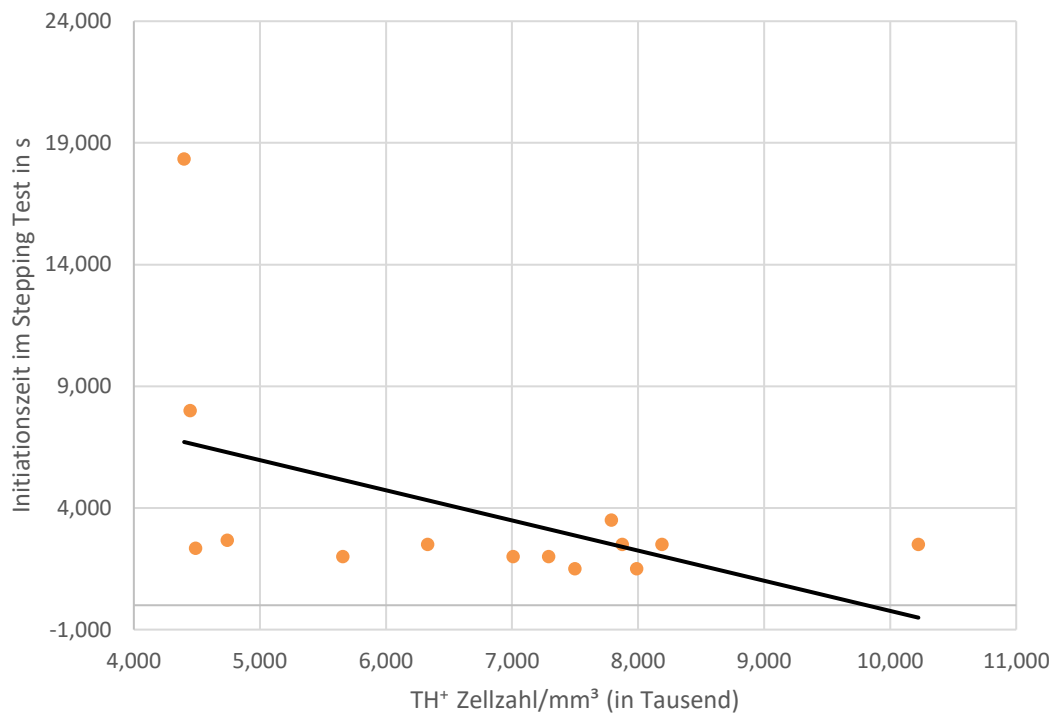


Abbildung 33: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Area tegmentalis ventralis nach 6 Wochen Stimulation mit der Initiationszeit im Stepping-Test

Dargestellt ist die Zellzahl/mm³ in Tausend in der ipsilateral zur Stimulation gelegenen VTA gegenüber der Initiationszeit in Sekunden im ST nach 6 Wochen. Es zeigt sich eine negative Korrelation mit einem Koeffizienten nach Pearson von -0,488. Zu beachten ist ein Ausreißer von 18,33s Initiationszeit.

Nach 6 Wochen durchgängiger THS finden sich mit im Mittel 70 ± 10 % zurückgelegter Wegstrecke ähnliche Werte vor und nach Stimulation. In der Gruppe L+S1+S2- konnte mit 142 ± 35 % sogar eine Verbesserung der Aktivität im OFT gezeigt werden, welche aber im Intergruppenvergleich mit der Kontrollgruppe nicht signifikant ist.

3.5 Korrelation der Histologie mit den Verhaltenstests

Um die histologischen Ergebnisse mit den Ergebnissen der Verhaltenstests in Zusammenhang zu bringen wurden zunächst Korrelationsanalysen durchgeführt. Hierbei wurde betrachtet inwiefern eine Veränderung in der Zellzahl in den einzelnen untersuchten Regionen mit einer Veränderung in den Parametern der beiden durchgeführten

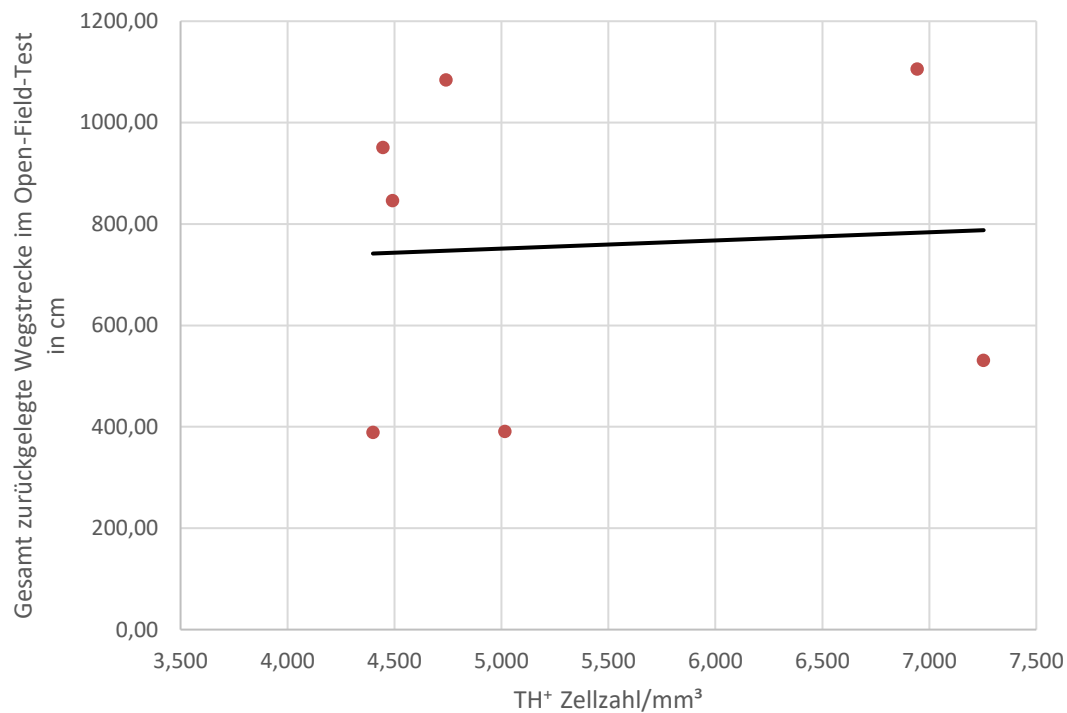


Abbildung 34: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Area tegmentalis ventralis nach 3 Wochen Stimulation mit der Wegstrecke im Open-Field-Test

Dargestellt ist die Zellzahl/mm³ in Tausend in der ipsilateral zur Stimulation gelegenen VTA gegenüber der gesamt zurückgelegten Wegstrecke im OFT über 3 Wochen. Es zeigt sich kein Zusammenhang der beiden Variablen bei einem Korrelationskoeffizient nach Pearson von 0,063.

Verhaltenstests einhergeht. Ein starker Zusammenhang wurde ab einem Korrelationskoeffizienten von >0,5 angenommen.

Für den ST wurde die Initiationszeit in Sekunden zum Zeitpunkt nach der Stimulation verwendet und für den OFT die insgesamt zurückgelegte Wegstrecke ebenfalls zum Zeitpunkt nach der Stimulation. Eine Verwendung der vorher berechneten Prä-Post-Quotienten war an dieser Stelle nicht möglich, da es keine entsprechenden Prä-Post-Werte für die Histologie gibt. Dies wäre in einem neuen Experiment in der Zukunft mittels funktioneller Bildgebung wie PET-CT möglich.

3.5.1 Vergleich ST mit Zelldichte in der VTA

Wird die Initiationszeit in Sekunden mit der Zelldichte in der ipsilateralen VTA nach 3-wöchiger THS miteinander verglichen, so zeigt sich ein statistisch nicht signifikanter

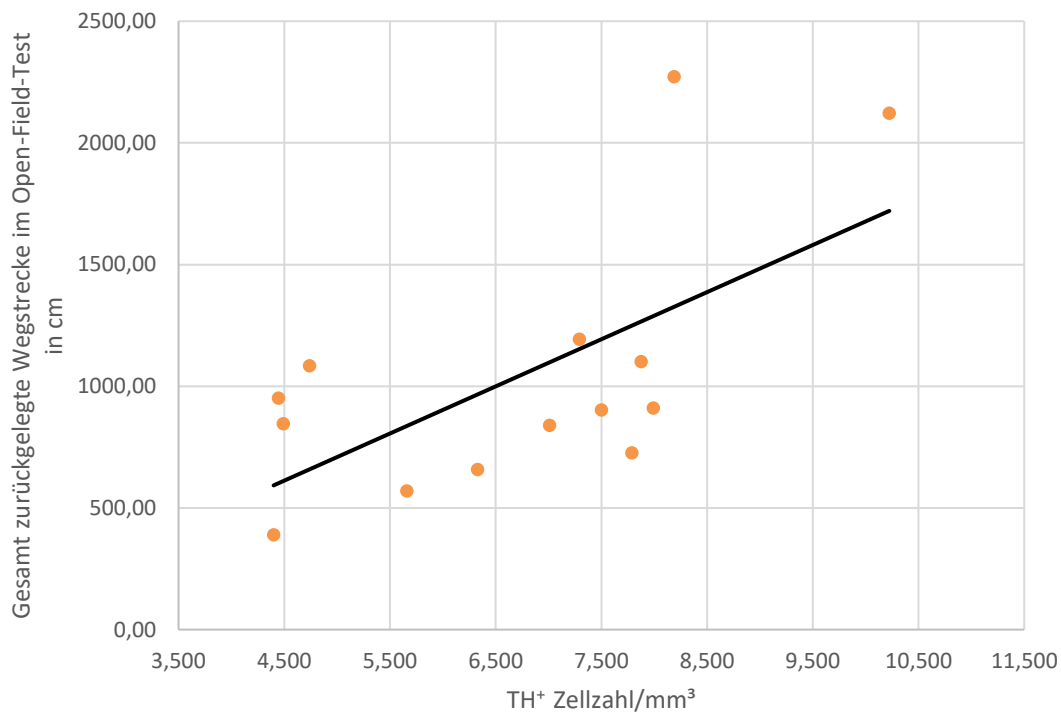


Abbildung 35: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Area tegmentalis ventralis nach 6 Wochen Stimulation mit der Wegstrecke im Open-Field-Test

Dargestellt ist die Zellzahl/mm³ in Tausend in der ipsilateral zur Stimulation gelegenen VTA gegenüber der gesamt zurückgelegten Wegstrecke im OFT. Es zeigt sich eine deutlich positive Korrelation mit einem Koeffizienten nach Pearson von 0,636. Dieser ist mit $p = 0,014$ signifikant.

negativer Korrelationskoeffizient von -0,504. Dieser Zusammenhang ist dargestellt in **Abbildung 32**. Vergleicht man die erreichte Initiationszeit in Sekunden mit der Zelldichte in der ipsilateralen VTA nach 6-wöchiger THS miteinander, so findet sich ein nicht statistisch signifikanter negativer Korrelationskoeffizient von -0,488 (siehe **Abbildung 33**). Zusammenfassend kann keine signifikante Korrelation, weder nach 3- noch nach 6-wöchiger Stimulation, zwischen den beiden Parametern Zelldichte VTA und ST Initiationszeit angenommen werden.

3.5.2 Vergleich OFT mit Zelldichte in der VTA

Vergleicht man die zurückgelegte Wegstrecke im OFT mit der Zelldichte in der ipsilateralen VTA nach 3 Wochen, so lässt sich kein Zusammenhang zwischen beiden Variablen finden. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt lediglich 0,063.

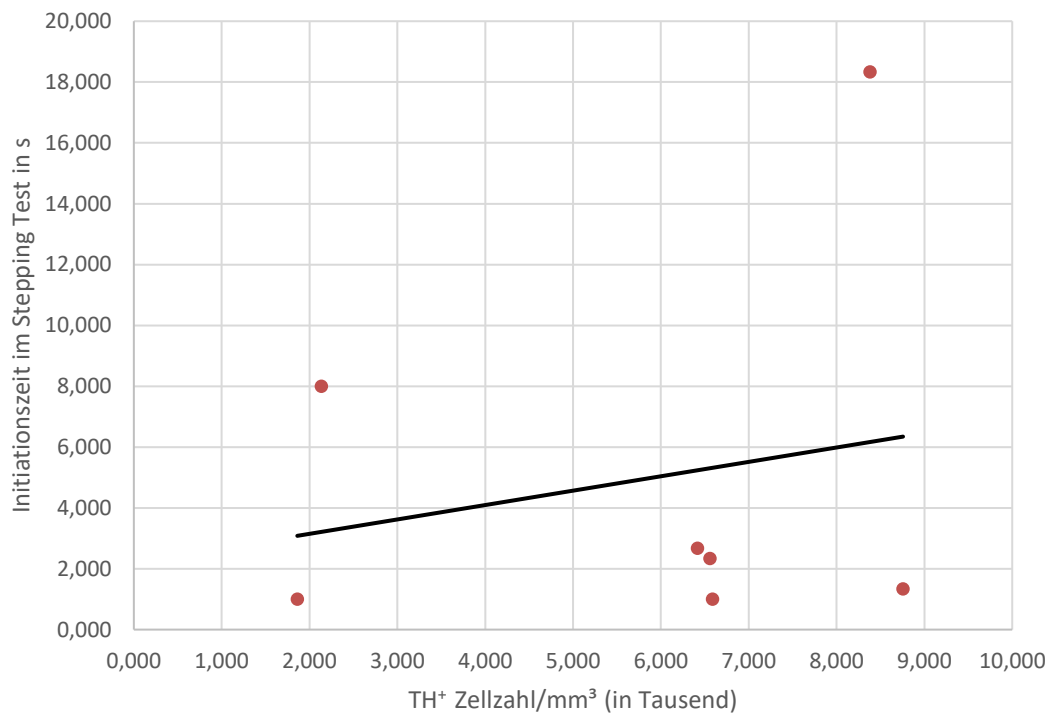


Abbildung 36: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Substantia nigra pars compacta nach 3 Wochen Stimulation mit der Initiationszeit im Stepping-Test

Dargestellt ist die Zellzahl/mm³ in Tausend in der ipsilateral zur Stimulation gelegenen SNpc gegenüber der Initiationszeit in Sekunden im ST nach 3 Wochen. Es zeigt sich eine positive Korrelation mit einem Koeffizienten nach Pearson von 0,205. Zu beachten ist der extreme Ausreißer von 18,33s Initiationszeit.

Korreliert man die zurückgelegte Wegstrecke im OFT mit der Zelldichte der ipsilateralen VTA nach 6 Wochen Stimulation, so lässt sich ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang finden. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,636 und ist auf einem Niveau von 0,014 (2-seitig) signifikant. Es zeigt sich also, dass eine hohe Zelldichte in der VTA mit einer hohen zurückgelegten Wegstrecke im OFT einhergeht.

3.5.3 Vergleich ST mit Zelldichte in SNpc

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen der Zelldichte in der ipsilateralen SNpc nach 3-wöchiger STN-THS mit der Initiationszeit im ST, so findet sich ein nicht statistisch signifikanter positiver Korrelationskoeffizient nach Pearson von 0,205 (siehe **Abbildung 36**). Vergleicht man die Zelldichte in der ipsilateral zur Stimulation gelegenen *Substantia*

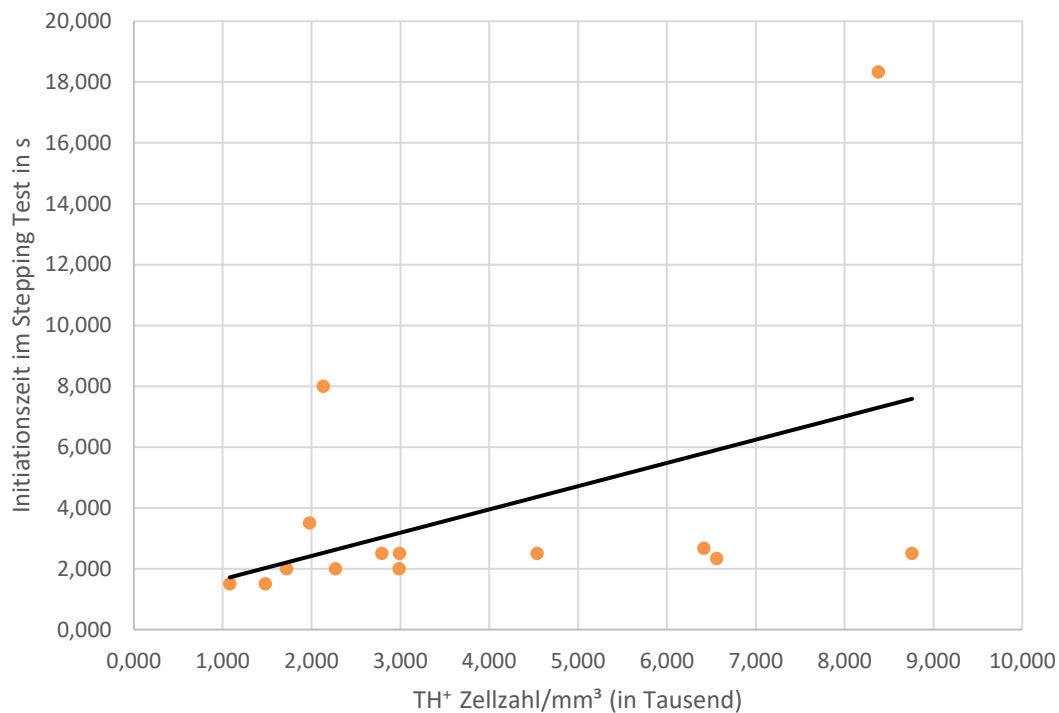


Abbildung 37: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Substantia nigra pars compacta nach 6 Wochen Stimulation mit der Initiationszeit im Stepping-Test

Dargestellt ist die Zellzahl/mm³ in Tausend in der ipsilateral zur Stimulation gelegenen SNpc gegenüber der Initiationszeit in Sekunden im ST. Es zeigt sich eine positive Korrelation mit einem Koeffizienten nach Pearson von 0,446. Zu beachten ist der extreme Ausreißer von 18,33s Initiationszeit.

nigra (pars compacta) mit der Initiationszeit im ST nach 6 Wochen THS, so findet sich ein mit 0,446 positiver Korrelationskoeffizient, der allerdings nicht statistisch signifikant ist. Dieser Zusammenhang ist in **Abbildung 37** dargestellt. Es kann hier nicht von einem starken Zusammenhang der beiden Parameter ausgegangen werden, weder nach 3-wöchiger noch nach 6-wöchiger STN-THS.

3.5.4 Vergleich OFT mit Zelldichte in SNpc

Wie in **Abbildung 38** dargestellt findet sich lediglich ein Korrelationskoeffizient nach Pearson von 0,173, wenn man die insgesamt im OFT zurückgelegte Wegstrecke mit der Zelldichte in der ipsilateral zur Stimulation gelegenen SNpc nach 3-wöchiger STN-THS miteinander vergleicht.

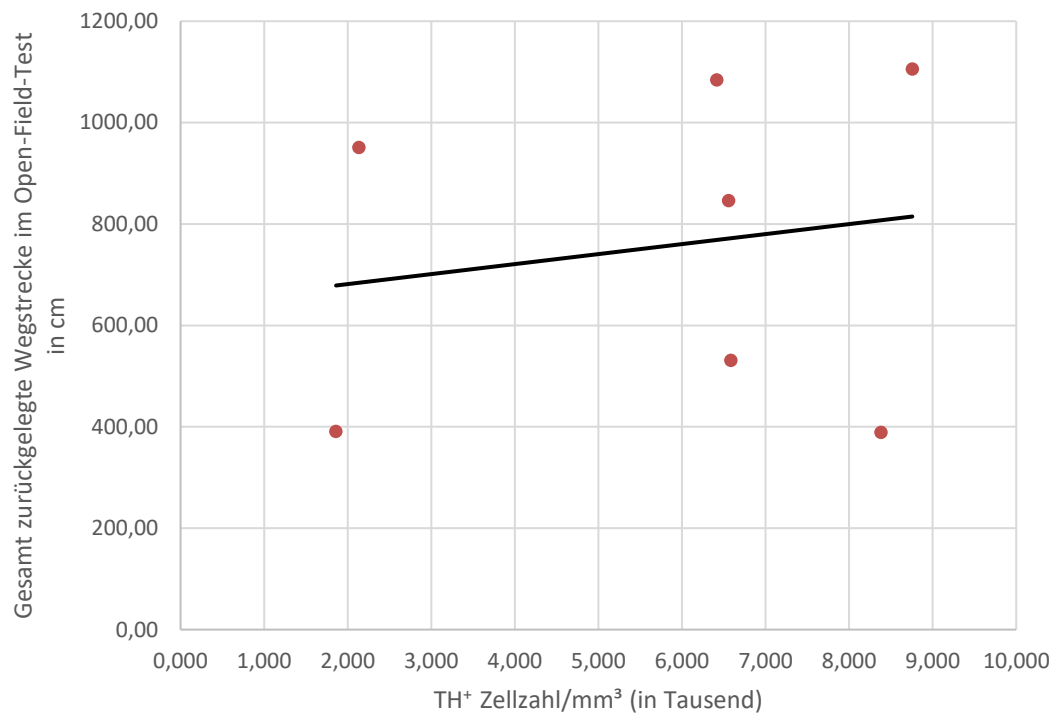


Abbildung 38: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Substantia nigra pars compacta nach 3 Wochen Stimulation mit der Wegstrecke im Open-Field-Test

Dargestellt ist die Zellzahl/mm³ in Tausend in der ipsilateral zur Stimulation gelegenen SNpc gegenüber der insgesamt zurückgelegten Wegstrecke im OFT über 3 Wochen. Es zeigt sich eine diskret positive Korrelation mit einem Koeffizienten nach Pearson von 0,173.

Bringt man die zurückgelegte Wegstrecke im OFT mit der Zelldichte der ipsilateralen SNpc nach 6-wöchiger Stimulation zusammen, so findet sich ein mit 0,344 diskret positiver Korrelationskoeffizient welcher nicht statistisch signifikant ist. Es kann auch hier nicht von einem signifikanten Zusammenhang der beiden Parameter gesprochen werden.

3.6 Kovarianzanalysen

Aufgrund des deutlich positiven Zusammenhangs einer hohen Zelldichte in der VTA mit der zurückgelegten Wegstrecke im OFT kann angenommen werden, dass der Parameter „Zelldichte VTA“ das Ergebnis der Stimulation auf den OFT konfundieren könnte. Um den Einfluss des Faktors Zelldichte auf die Verhaltenstests herauszurechnen wurde eine Kovarianzanalyse (ANCOVA) durchgeführt.

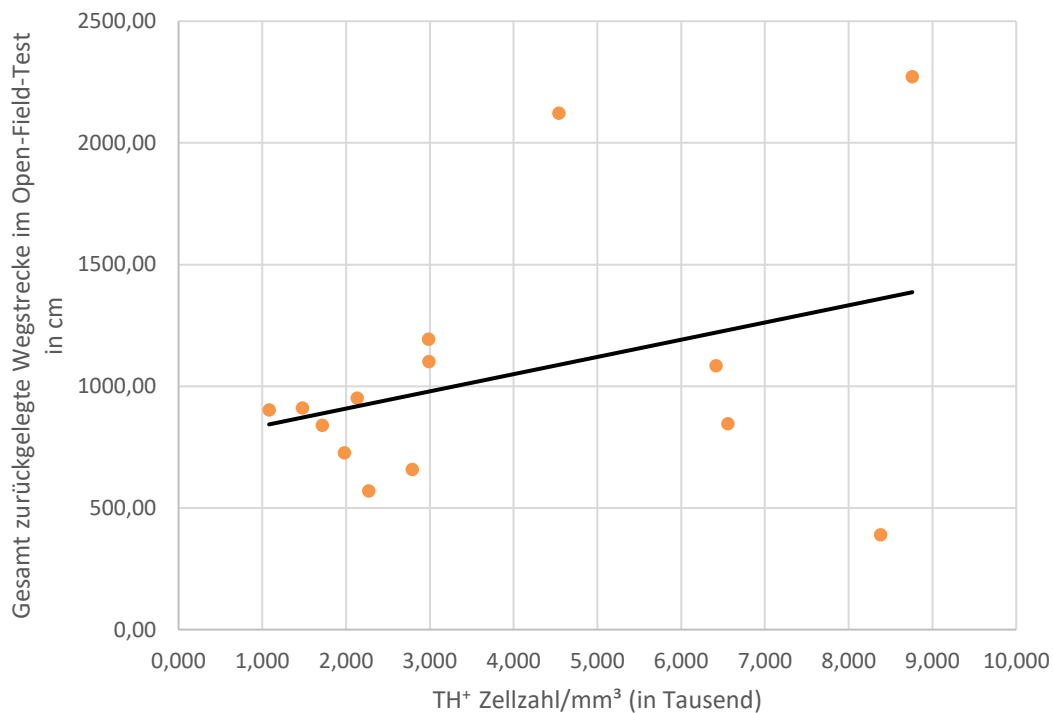


Abbildung 39: Vergleich der Zelldichte in der ipsilateralen Substantia nigra pars compacta nach 6 Wochen Stimulation mit der Wegstrecke im Open-Field-Test

Dargestellt ist die Zellzahl/mm³ in Tausend in der ipsilateral zur Stimulation gelegenen SNpc gegenüber der insgesamt zurückgelegten Wegstrecke im OFT nach 6 Wochen. Es zeigt sich eine diskret positive Korrelation mit einem Koeffizienten nach Pearson von 0,344.

3.6.1 Einfluss 6-wöchige THS auf den ST

Betrachtet man den Einfluss der 6-wöchigen THS auf die Initiationszeit im ST, so findet man keinen Unterschied zwischen den Parametern mit oder ohne Berücksichtigung der Zelldichte in der VTA als Kovariate, wie **Abbildung 40** zeigt. Die Mittelwerte der Initiationszeit in der Kontrollgruppe betragen 7,83s gegenüber 7,684s wenn man die Zelldichte der VTA als Kovariate berücksichtigt.

In den beiden Stimulationsgruppen verhält es sich ähnlich. Die Initiationszeit der Gruppe L+S1+S2- betrug im Mittel 2,2 s gegenüber 2,3 s unter Einschluss der Zelldichte der VTA, die der Gruppe L+S1+S2+ betrug 2,3 s gegenüber 2,3 s mit der Kovariate.

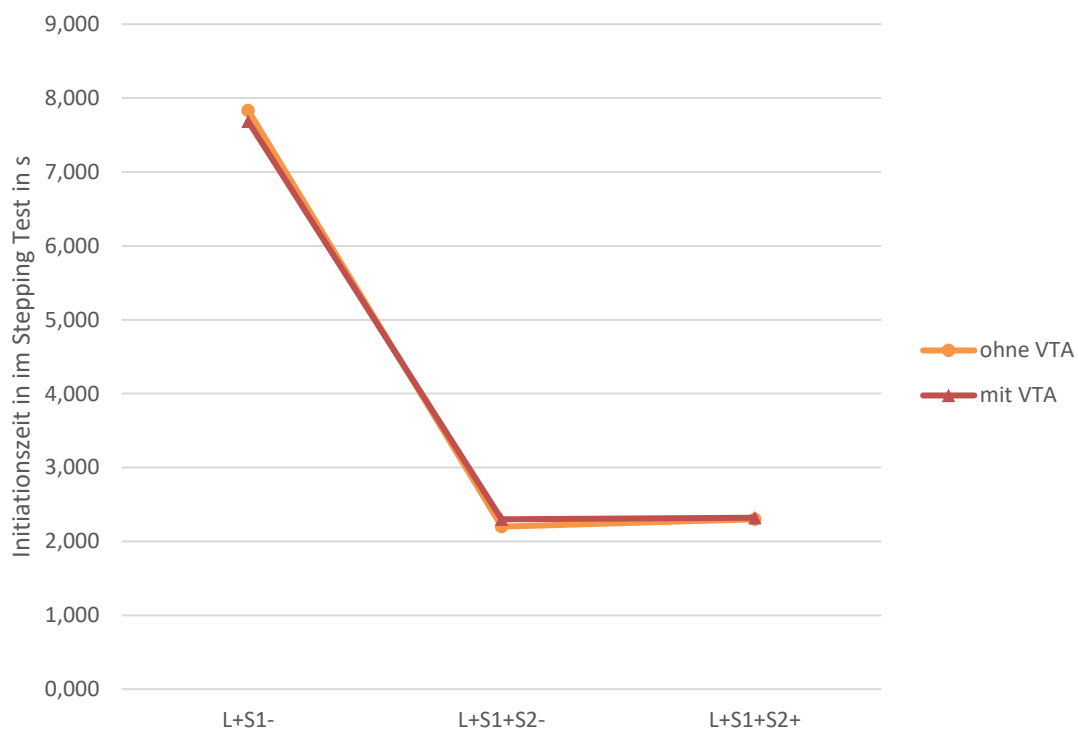


Abbildung 40: Einfluss der 6-wöchigen THS auf die Initiationszeit im Stepping-Test

Dargestellt ist die Initiationszeit der ipsilateralen Vorderpfote in Sekunden im ST über die drei Gruppen L+S1- (Kontrolle) gegenüber den beiden Stimulationsgruppen L+S1+S2- und L+S1+S2+. Die orangene Linie mit Wertepunkten symbolisiert den Verlauf ohne die Zelldichte der ipsilateralen VTA als Kovariate einzubeziehen. Die rote Linie mit Wertedreiecken symbolisiert den Verlauf mit der Zelldichte der ipsilateralen VTA als Kovariate.

3.6.2 Einfluss 6-wöchige THS auf den OFT

Führt man eine Kovarianzanalyse mit der Zelldichte in der VTA als Kovariate für den Zusammenhang der 6-wöchigen THS auf die zurückgelegte Wegstrecke im OFT durch, dann finden sich deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen.

Wie in **Abbildung 30** gezeigt findet sich nach 3 Wochen THS zwar eine signifikant niedrigere zurückgelegte Wegstrecke im OFT, dieser Effekt verschwindet allerdings nach 6 Wochen wieder (**Abbildung 31**).

Berücksichtigt man nun die Korrelation einer hohen Zelldichte in der VTA mit einem guten Ergebnis im OFT (**Abbildung 35**), so lässt sich schließen, dass die hohe Zellzahl in der VTA das Ergebnis der Stimulation auf den OFT beeinflusst. Dieser Zusammenhang wird in **Abbildung 41** deutlich. Vergleicht man nun die korrigierten mittleren zurückgelegten



Abbildung 41: Einfluss der 6-wöchigen THS auf die Wegstrecke im Open-Field-Test

Dargestellt ist die zurückgelegte Wegstrecke im OFT in cm über die drei Gruppen L+S1- (Kontrolle) gegenüber den beiden Stimulationsgruppen L+S1+S2- und L+S1+S2+. Die orangene Linie mit Wertepunkten symbolisiert den Verlauf ohne die Zelldichte der ipsilateralen VTA als Kovariate einzubeziehen. Die rote Linie mit Wertedreiecken zeigt den Verlauf mit der Zelldichte der ipsilateralen VTA als Kovariate.

Wegstrecken (unter Berücksichtigung der VTA als Kovariate), so findet sich ein signifikant ($p = 0,033$) schlechteres Ergebnis im OFT in der Gruppe L+S1+S2- gegenüber der Kontrollgruppe. Für die Gruppe L+S1+S2+ ist dies immerhin als statistischer Trend auch sichtbar ($p = 0,072$). Der Effekt also, den man auch nach 3 Wochen Stimulation gesehen hatte. Diesen Zusammenhang zeigt **Abbildung 42**. Die mittlere zurückgelegte Wegstrecke in der Kontrollgruppe beträgt jetzt 1864 cm mit einem Standardfehler von 286 cm gegenüber 478 ± 214 cm in der Gruppe L+S1+S2- und 943 ± 154 cm in der Gruppe L+S1+S2+.

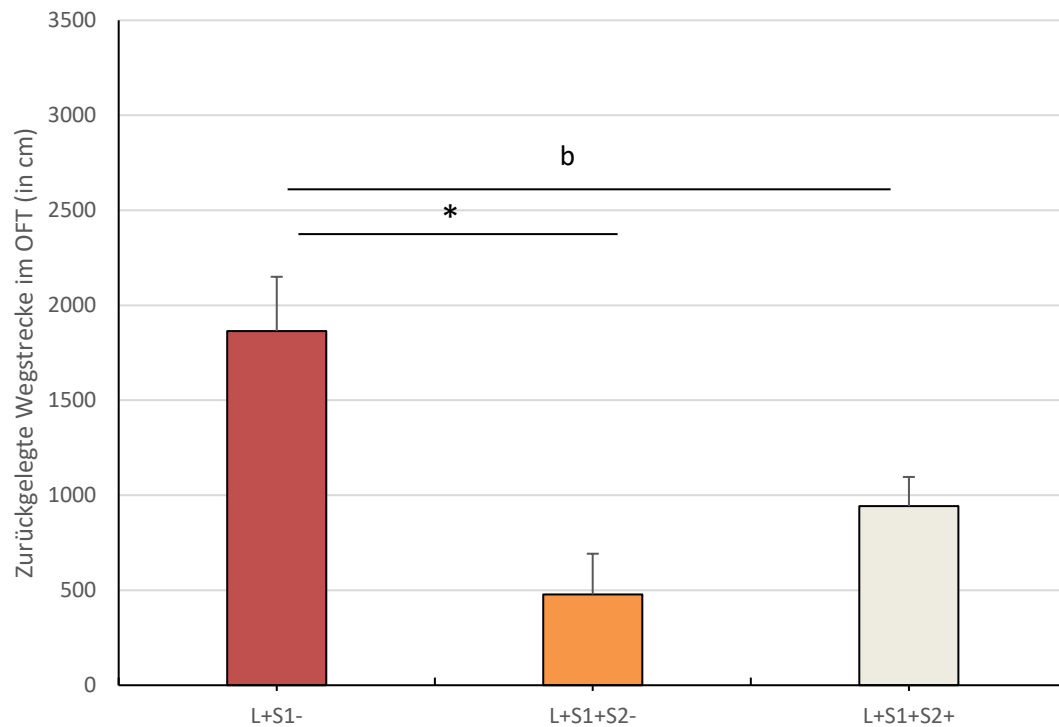


Abbildung 42: Einfluss der 6-wöchigen THS auf die Wegstrecke im Open-Field-Test korrigiert für die Zelldichte in der ipsilateralen Area tegmentalis ventralis

Dargestellt ist die insgesamt zurückgelegte Wegstrecke im OFT in cm über die Gruppen L+S1- (Kontrolle) sowie die beiden Stimulationsgruppen L+S1+S2- und L+S1+S2+, wenn man die Zelldichte der ipsilateralen VTA als Kovariate verwendet. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe L+S1+S2- sowie ein statistischer Trend zwischen der Kontrolle und der Gruppe L+S1+S2+. Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). P-Werte nach Student-t-Test ermittelt.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, potentielle neurorestaurative Wirkungen der STN-THS in einem Langzeitstimulationsmodell der Ratte aufzuzeigen sowie diese mit den in Verhaltenstests gefundenen Veränderungen in Verbindung zu bringen. Obwohl die STN-THS eine in der Therapie des IPS seit vielen Jahren etablierte Methode ist, sind die zugrundeliegenden Mechanismen immer noch unzureichend verstanden. Tiermodelle tragen hier zum Verständnis sowie zur Optimierung der Parameter der THS bei (31, 116). Das Besondere des hier verwendeten Tiermodells ist, dass es Verhaltensuntersuchungen an vollkommen frei beweglichen Ratten über lange Zeiträume von bis zu 6 Wochen ermöglicht.

Der Fokus dieser Arbeit lag insbesondere auf den nicht-motorischen Effekten bzw. Nebenwirkungen der THS. In den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) werden Patienten mit nicht medikamentös-induzierten psychiatrischen Auffälligkeiten von einer THS Therapie ausgeschlossen. Dies liegt nicht zuletzt auch darin begründet, dass man unter THS eine erhöhte Inzidenz psychiatrischer Symptome wie Angst oder Depression findet (63, 72, 62, 76). Für diesen Sachverhalt gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze, wobei eine zu schnelle postoperative Reduktion der dopaminergen Medikation eine Rolle spielen könnte (117, 118). Andererseits ist das Auftreten psychiatrischer Nebenwirkungen abhängig von der stimulierten Region und sogar von der Mikrolage innerhalb einer Region. Die Stimulation des GPi oder VIM sind weniger mit psychiatrischen Nebeneffekten vergesellschaftet als die des STN. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Regionen GPi und VIM um ein Vielfaches größer sind als der STN und damit Fehllagen der Elektrode seltener vorkommen (menschliche STN-Größe nach Schaltenbrand und Wahrens Atlas: 12x12x5mm, Elektrodengröße: 1,5mmx1,27mm). Außerdem könnte die zuvor beschriebene funktionelle Dreiteilung des STN die Effektivität der THS beeinflussen. Der dorsolaterale Teil des STN repräsentiert seinen motorischen Anteil und ist das Ziel der neurochirurgischen Operation (119). Die mediale Spitze des STN ist dagegen eher Teil limbischer Schleifen und daher nicht primäres Ziel einer Tiefen Hirnstimulation beim IPS, wobei diese Selektivität bei den gegebenen Größenverhältnissen in der Praxis häufig schwer zu realisieren ist (120, 121).

4.1 Effektivität des Tiermodells

Zunächst wurde die Effektivität der 6-OHDA-Läsion auf die dopaminergen Strukturen in SNpc und VTA überprüft. Hierbei zeigte sich, dass die verwendete Methode der 6-OHDA-Injektion in das MVB in der Lage war, die Zelldichte TH⁺ Neurone in beiden Regionen auf der ipsilateralen Seite signifikant zu reduzieren ohne einen Einfluss auf die kontralaterale Seite zu haben (**Abbildung 16** und **Abbildung 21**). Der LC dagegen ist nicht von der Läsion betroffen (**Abbildung 27**). Diese Veränderungen wurden bereits ausführlich durch andere Autoren untersucht und quantifiziert. Yuan und Mitarbeiter [2005] (101) beschreiben Zellverluste TH⁺ Zellen von 82% nach 3 Wochen in der SN und 54% in der VTA. In unserem Modell war eine vollständige Auszählung der entsprechenden Areale nicht notwendig, weshalb keine Angabe der absoluten Zellzahlen und damit kein exakter Vergleich mit entsprechenden Studien möglich war. Es kann jedoch von einem vergleichbaren Effekt ausgegangen werden.

4.2 Einfluss der THS auf die neuronale Plastizität in der SNpc

Einige Autoren berichten über eine Zunahme der Zellzahl in der SNpc nach Läsion oder THS des STN (122–125). Es ist allerdings nicht abschließend geklärt, ob es sich bei den gefundenen TH⁺ Zellen um durch Neurogenese entstandene Zellen handelt. Zhao und Mitarbeiter [2003] (126) fanden Hinweise auf Neurogenese in der SN, welche man durch experimentelle Läsionierung induzieren kann. Andere Autoren konnten ebenfalls Hinweise auf Stammzellen in der *Substantia nigra* finden, wobei sich diese eher zu Mikroglia entwickeln, als zu dopaminergen Zellen (127, S. 31). Durch verschiedene Autoren wird außerdem ein Anstoß von Neurogenese durch THS postuliert, allerdings bisher nur im Bereich des Hippocampus (128, 129). Frielingsdorf und Mitarbeiter [2004] (130) widerlegten eine Neurogenese dopaminerger *Substantia nigra*-neurone eindrucksvoll. Sie fanden mit ähnlichen Methoden wie Zhao und Mitarbeiter weder Hinweise auf Neurogenese in der SNpc noch auf Migration neuronaler Stammzellen aus den periventrikulären Stammzellnischen in die *Substantia nigra*. Daher ist eine Neurogenese dopaminerger Zellen in der SN aktuell als unwahrscheinlich zu betrachten.

Ein weiterer Mechanismus, der zur vermehrten Expression TH⁺ Zellen in der SN beitragen könnte, ist der phänotypische Switch nicht-dopaminergem Zelltypen zu dopaminergen. Dieser Mechanismus ist für andere Nervenzellgruppen beschrieben. Neurotransmitterwechsel auf bestimmte externe Stimuli kommen bspw. im Hypothalamus vor, wo Somatostatin Neurone durch Exposition zu langen oder kurzen Lichtperioden zu dopaminergen Neuronen werden (131). Auch in monoaminergen Zellpopulationen wurde dieser Effekt beschrieben (Wechsel von serotoninerg zu dopaminerg) (132).

Die TH-Expression ist außerdem aktivitätsabhängig und beginnt sich nach etwa 20h Dauer einer veränderten neuronalen Aktivität deutlich zu ändern. Dies konnte auch für die *Substantia nigra* gezeigt werden (133–135). Es ist sogar möglich die Anzahl der TH⁺ Zellen in der SN durch Infusion bestimmter Ionenkanal-Agonisten oder Antagonisten um bis zu 10% zu verändern. Diese Studien zeigen auf, dass der Transmitterbesatz von Nervenzellen des ZNS nicht fix ist, sondern auf Umweltreize reagieren und sich verändern kann. Über diesen als Neurotransmitter-Plastizität bezeichneten Mechanismus wäre es auch möglich, die veränderte Zellzahl nach THS zu erklären. Um diesen Effekt in Zukunft weiter zu untersuchen müsste man neben der Zählung TH⁺ Neurone noch die Gesamtzahl der in der entsprechenden Region enthaltenen Nervenzellen betrachten.

Ein vielversprechender Ansatz zur Erklärung einer Zellzahlzunahme in vom STN innervierten Regionen ist die durch ungehemmte synaptische Glutamatfreisetzung verursachte Exzitotoxizität. Eine ungehemmtes Glutamat-Angebot führt in der postsynaptischen Zelle zur Aktivierung von Ca-Kanälen, ein konsekutiver intrazellulärer Calciumexzess wiederum führt über verschiedene Signalkaskaden schlussendlich zum Zelltod (136, 137). Die Steigerung der Glutamatfreisetzung in der SN im Rahmen eines IPS sowie in den Parkinsontiermodellen wird durch einen aufgrund Dopaminmangels disinhibierten STN verursacht. Folglich ist ein Zellschaden in allen vom STN innervierten Regionen denkbar (138). Eine THS des STN führt nachweislich zur Reduktion der Feuerrate glutamaterger STN Neurone (45, 139, 140). Über diesen Mechanismus könnte die THS neurorestaurativ wirken. Dieser Ansatz wurde bereits von anderen Autoren als Begründung für die durch THS verursachte Zellzahlerhöhung in der SN verwendet (125, S. 100).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die bereits beschriebene neurorestaurative Wirkung der STN-THS auf die SNpc zu bestätigen, in unserem Modell konnte allerdings kein solches Ergebnis gefunden werden. Es zeigte sich weder nach dreiwöchiger noch nach sechswöchiger THS eine signifikante Veränderung der Zellzahl in der SNpc gegenüber der Kontrolle ohne THS (**Abbildung 18** und **Abbildung 19**).

4.3 Einfluss der THS auf die Motorik

Um den Einfluss der THS auf die Motorik zu beurteilen wurde der Stepping-Test herangezogen. Eine lange Initiationszeit gilt entsprechend als Zeichen der Bradykinese. Die Initiationszeit wird in der Literatur als sensitivster Parameter im Rahmen des ST beschrieben, daher wurde auf die Angabe weiterer Parameter wie der Anzahl der Ausfallschritte verzichtet (107).

Die Verbesserung motorischer Kardinalsymptome durch STN-THS gilt sowohl in Parkinsonmodellen der Ratte als auch beim Parkinsonpatienten als etabliert (141–143). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Modell konnte nach 3 Wochen ipsilateraler THS ein signifikant positiver Einfluss auf die Motorik gefunden werden (**Abbildung 28**), welcher allerdings nach 6 Wochen Stimulation nicht mehr vorhanden war (**Abbildung 29**).

Um den potentiellen Einfluss zellulärer Veränderungen auf diesen Effekt zu untersuchen wurden zunächst Korrelationsanalysen mit den Ergebnissen des ST und den in SNpc und VTA gefundenen Zelldichten durchgeführt. Nach 3- bzw. 6-wöchiger THS konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Ergebnis im ST und der Zelldichte in der SNpc gefunden werden (**Abbildung 36** und **Abbildung 37**). Auch zwischen ST und Zelldichte in der VTA fand sich weder nach drei noch nach 6 Wochen THS eine signifikante Korrelation.

Im nächsten Schritt wurde, um für die Zelldichte in der SN zu korrigieren eine Kovarianzanalyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Einfluss der THS auf den ST von der Höhe der Zelldichte in der SNpc unabhängig ist (**Abbildung 40**). Es ist zu beachten, dass für letzteren Vergleich nicht wie in **Abbildung 28** und **Abbildung 29** die Quotienten des Ergebnisses vor der Stimulation und nach der Stimulation gebildet wurden, sondern die

Absolutwerte nach Stimulation verwendet werden mussten. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass man methodisch bedingt keine prä-post-Vergleichswerte für die Histologie zur Verfügung hatte und dementsprechend diese beiden Parameter lediglich im Zustand nach erfolgter Stimulation miteinander vergleichen konnte. Daher erscheint es in **Abbildung 40** so, als hätten sich die Tiere durch die Stimulation verbessert, was aber in den entscheidenderen prä-post-Quotienten nicht der Fall ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich:

- eine 3-wöchige THS positiv auf die Motorik im ST auswirkt und
- nach 6 Wochen THS ein noch unbekannter Faktor diesen Effekt neutralisiert, welcher nicht in den histologisch betrachteten Regionen SNpc und VTA gefunden werden konnte.

4.4 Einfluss der THS auf die neuronale Plastizität im LC

Im Rahmen der Parkinsonkrankheit spielt nicht nur die Degeneration dopaminerger Zellgruppen eine Rolle, sondern auch noradrenerge Strukturen wie der *Locus coeruleus* sind vom Zellverlust betroffen (144). Im Rahmen des hier gewählten Tiermodells bleibt der LC jedoch vom Toxin unbeeinflusst. Allerdings gibt es Hinweise, dass die STN-THS den *Locus coeruleus* im Menschen negativ beeinflusst. Im Rahmen einer großen post-mortem Analyse an IPS Patienten fand man eine größere Last an α -Synuclein Pathologien im LC, wenn diese zu Lebzeiten eine STN-THS erhalten hatten. Dieser Effekt war auch sichtbar, nachdem man für Krankheitsdauer und -schwere korrigiert hatte (145). Analog zu diesen Daten würde man nach STN-THS eine verminderte Zelldichte TH⁺ Zellen im LC erwarten. Wie in **Abbildung 27** dargestellt, konnte kein solcher Einfluss der THS auf die Dichte TH⁺ Zellen im LC gefunden werden, weder ipsi- noch kontralateral zur stimulierten Hemisphäre. Limitierend ist anzumerken, dass lediglich die 6-Wochen Gruppen untersucht werden konnten, da methodisch bedingt bei einem Großteil der Gruppen auf die Konservierung des Hirnstamms verzichtet wurde.

4.5 Einfluss der THS auf die neuronale Plastizität in der VTA

Die VTA unterhält zahlreiche Verbindungen zum STN und wird von diesem glutamaterg innerviert (146). Die limbische Region des STN ist in einen Kreislauf mit dem mesolimbischen dopaminergen Pfad über die VTA und den Ncl. accumbens zu weiteren limbischen kortikalen Strukturen eingebettet. Die mediale Spitze des *Nucleus subthalamicus* repräsentiert seinen limbischen Anteil. Dieser Subnucleus erhält Afferenzen u.a. aus dem *Nucleus accumbens* und der VTA und projiziert zum limbischen Teil der *Substantia nigra* und der VTA. Damit ist der STN eine der zentralen Kontrollstationen des limbischen Systems (120). Innerhalb dieses Modells werden emotionale und motivationale Informationen, welche aus dem medialen präfrontalen Kortex kommen neokortikal integriert, in den Basalganglien gelernt und im Papez-Neuronenkreis gespeichert (146, S. 424–425). Das könnte erklären, dass limbische Dysfunktionen nach subthalamischer Stimulation auftreten, da hier empfindliche Informationen zwischen dem STN und der VTA gestört werden (147).

Aufgrund dieser Verbindungen würde man also analog zu den von zahlreichen Autoren gefundenen Veränderungen der SN nach STN-THS auch in der VTA eine erhöhte Zelldichte durch verminderte Exzitotoxizität erwarten. In diesem Modell konnte diese Zellzahlzunahme sowohl nach 3-wöchiger THS als auch nach 6-wöchiger THS gefunden werden (**Abbildung 23** und **Abbildung 25**). Dieser Zusammenhang ist stabil und über drei unabhängige Gruppen nachweisbar. Als Limitation des gewählten Versuchsdesigns könnte angeführt werden, dass es nur eine über 3 Wochen mitgeführte Kontrollgruppe mit Scheinstimulation gab. Um einen exakteren Vergleich mit den über 6 Wochen beobachteten Tieren zu erhalten, wäre es notwendig gewesen, noch eine zweite Kontrollgruppe mit längerer Überlebenszeit zu haben. Dennoch kann angenommen werden, dass sich bei lediglich schein-stimulierten Tieren nach 6 Wochen ein ähnliches Ergebnis gefunden hätte, wie das nach 3 Wochen beobachtete.

Im Gegensatz zur SN gibt es für die VTA keine Berichte über adulte Neurogenese. Dieser Mechanismus ist also zum aktuellen Zeitpunkt aufgrund mangelnder Studien zu diesem Thema schwer zu diskutieren. Ein phänotypischer Switch durch Transdifferenzierung

nicht-dopaminergem Interneurone durch die Stimulation wäre als der gefundenen erhöhten Zelldichte TH⁺ Neurone zugrunde liegender Mechanismus denkbar.

Außerdem gibt es auch für die VTA Berichte über durch externe Stimuli angestoßene Neurotransmitter-Plastizität (135).

Ungeklärt bleibt, warum man diese Veränderungen zwar in der VTA, nicht aber in der SN findet. Eine mögliche Erklärung wäre es, dass der von uns verwendete Elektrodenzielpunkt zu weit medial-rostral im limbischen Teil des STN gewählt wurde. Insbesondere aus diesem Teil des STN gelangen Efferenzen zur VTA (146). Diese Hypothese gilt es in zukünftigen Versuchsdesigns zu falsifizieren.

4.6 Einfluss der Zelldichte auf das Angstverhalten

Wie weiter oben erläutert gibt es aktuell eine sehr kontroverse Studienlage zum Thema psychiatrische Effekte der STN-THS. Es ist weiterhin unklar, ob die THS psychiatrische Symptome verursacht, keinen Einfluss hat, oder sie eher verbessert. Beschrieben sind sowohl Angst, Depression als auch Apathie nach THS (63, 72). Obwohl einige Autoren auch von einer Verbesserung psychiatrischer Symptome berichten, ist aktuell vor Beginn einer THS zu prüfen, ob eine vorbestehende psychiatrische Erkrankung besteht und es gilt in diesem Fall die Indikation zur THS kritisch zu überprüfen.

Im Tiermodell wurde durch Reymann und Mitarbeiter [2013] (148) gezeigt, dass eine bilaterale Läsion des STN zur vermehrten Ausprägung von ängstlichem Verhalten bei den Tieren führt. Diese Studie bestätigt eindrücklich den Einfluss des STN auf limbische Funktionen.

In unserem Modell wurde als Test um das Ängstlichkeitsverhalten der Tiere zu quantifizieren der Open-Field-Test durchgeführt. Betrachtet man den Einfluss der Stimulation auf die Ergebnisse im OFT, so findet sich nach 3 Wochen Stimulation ein signifikant schlechteres Abschneiden der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Scheinstimulation (**Abbildung 30**). Dieser Effekt ist nach 6 Wochen allerdings nicht mehr nachweisbar (**Abbildung 31**). Es konnte folglich das kurzfristige Auftreten von gesteigertem Ängstlichkeitsverhalten nach STN-THS bestätigt werden, wobei dieses im weiteren Verlauf der Therapie wieder verschwindet. Nach 6 Wochen könnte ein Lern- und Gewöhnungseffekt

eine Rolle spielen, da die Tiere die Bedingungen im OFT bereits kennen. Um diesen Effekt gering zu halten, wurde die Anzahl der Testungen auf drei Mal pro Lebenszeit eines Tieres reduziert. In zukünftigen Versuchsdesigns wäre es außerdem wünschenswert, zusätzliche spezifische Verhaltenstests wie den *elevated plus maze* zu verwenden, da der OFT nicht nur durch Angstverhalten, sondern auch durch das generelle lokomotorische Aktivitätsniveau des Tieres beeinflusst wird.

Eine zentrale Frage, die die Daten aufwirft ist, inwiefern sich die in der VTA gefundene erhöhte Zelldichte mit dem durch die THS verursachten Ängstlichkeitsverhalten in Verbindung bringen lässt. Diesbezüglich wurde zunächst versucht, die Parameter: „Zelldichte in der VTA“ und „zurückgelegte Wegstrecke im OFT“ mittels Korrelationsanalyse zu untersuchen.

Überraschenderweise korreliert eine erhöhte Zelldichte in der VTA nach 6 Wochen eher mit einem guten Ergebnis im OFT und damit einem tendenziell geringeren Ängstlichkeitsverhalten (**Abbildung 35**). Nach 3 Wochen Stimulation ist dies noch nicht der Fall. Hier findet sich kein Zusammenhang zwischen Zelldichte und Ängstlichkeitsverhalten (**Abbildung 34**).

Auch für die SNpc lässt sich kein Zusammenhang zwischen Zelldichte und Ängstlichkeitsverhalten feststellen. Weder nach 3- noch nach 6-wöchiger THS gibt es eine signifikante Korrelation (**Abbildung 38** und **Abbildung 39**).

Die Erkenntnis, dass eine verminderte Anzahl/Aktivität dopaminerger Zellen in der VTA mit dem Auftreten von depressivem oder ängstlichem Verhalten zusammenhängt wurde bereits von zahlreichen Autoren berichtet (149–151). Allerdings ist anzumerken, dass die Organisation der VTA komplex ist und unterschiedliche Subpopulationen dopaminerger Neurone existieren, welche nicht nur zu verschiedenen Hirnregionen projizieren, sondern sich funktionell erheblich unterscheiden (152–154). An dieser Stelle kann also weder mit Sicherheit gesagt werden, innerhalb welcher Gruppe von Nervenzellen die THS zu einer Veränderung geführt hat, noch welche dopaminergen Zellgruppen der VTA aktiviert wurden, um zu einem verminderten Ängstlichkeitsverhalten zu führen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die THS des STN zu einer erhöhten Zelldichte TH⁺ VTA-Neurone führt, welche wiederum mit einem besseren Ergebnis im OFT

korreliert. Offen bleibt, warum sich diese Korrelation nach 6-wöchiger, nicht aber nach 3-wöchiger Stimulation findet. Sollte es sich bei den gefundenen Nervenzellen um phänotypisch veränderte Nervenzellen handeln, könnte es sein, dass diese zunächst funktionell in bestehende Regelkreise integriert werden müssen und diese Anpassungsvorgänge nach 3 Wochen nicht abgeschlossen sind. Auch für die Hypothese der Neuroprotektion durch verminderte Exzitotoxizität kann eine gewisse Latenz der Wirkung angenommen werden.

In Kenntnis dieser Zusammenhänge muss die Zellzahl in der VTA als eine das Ergebnis des OFT positiv beeinflussende Kovariate angesehen werden. Um deren Einfluss entsprechend zu berücksichtigen wurde eine Kovarianzanalyse mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluss der THS auf das Angstverhalten im OFT unabhängig von der Zellzahl in der VTA zu beurteilen. Diese Zusammenhänge sind in **Abbildung 41** und **Abbildung 42** dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die Tiere durch die Stimulation nach 3 Wochen schlechter im OFT abschneiden während dieser Effekt nach 6 Wochen nicht mehr vorhanden ist. Bezieht man nun die Zelldichte in der VTA als Kovariate mit ein, dann reduziert sich der durch sie verursachte positive Einfluss auf das Ergebnis im OFT und der Einfluss der THS wird sichtbar im Sinne eines signifikant schlechteren Abschneidens auch nach 6 Wochen. Dieser Effekt ist für die Gruppe signifikant, welche einer 3-wöchigen THS unterzogen wurde, die Tiere allerdings über weitere drei Wochen nach Abschalten des Stimulators beobachtet und getestet wurden. Für die Gruppe mit sechs Wochen durchgängiger THS findet sich ebenfalls ein schlechteres Abschneiden im OFT, allerdings lediglich als statistischer Trend ($p = 0,072$).

Diese Kausalkette führt zu zwei Schlussfolgerungen:

1. Der negative Einfluss auf das Angstverhalten durch die THS scheint von der Region VTA unabhängig zu sein.
2. Der gefundene Effekt wird nach 3 Wochen Stimulation angestoßen, ist aber erst nach 6 Wochen nachweisbar.

Letzteres vermutlich durch die o.g. nötige funktionelle Integration der VTA Neurone.

In dieser Arbeit konnten also drei unabhängig voneinander bestehende Effekte der THS gezeigt werden:

- die THS hat eine neurorestaurative Wirkung auf dopaminerge Nervenzellen der *Area tegmentalis ventralis*,
- die THS führt zu psychiatrischen Nebenwirkungen im Sinne eines gesteigerten Angstverhaltens und
- die neurorestaurative Wirkung auf die VTA neutralisiert nach 6 Wochen das eigentlich durch die STN Stimulation verursachte Angstverhalten.

Da die VTA nicht für die gefundene THS-abhängige Verhaltensänderung verantwortlich zu sein scheint, stellt sich die Frage, wie die STN-THS zu dem auch bei zahlreichen Patienten gefundenen Symptom Angst führen kann. Der STN ist ein kleines Kerngebiet von etwa 167 mm³ (beim Menschen) in dessen unmittelbarer Nähe sich zahlreiche sensible Strukturen befinden. Eine Elektrodenlokalisation in seinem limbischen Teil (mediale Spitze) kann nicht nur zur Beeinflussung von mit dieser Region efferent verbundenen Arealen führen, sondern auch zur unbeabsichtigten Stimulation benachbarter Areale wie bspw. des MVB. Innerhalb des MVB ziehen zahlreiche Fasern zur Amygdala, eine eng mit Ängstlichkeitsverhalten assoziierte Region. Andere benachbarte limbische Strukturen beinhalten die *Zona incerta* sowie den lateralen Hypothalamus (155). Letzterer unterhält wiederum Verbindungen zum *Nucleus accumbens* und hat daher ebenfalls einen Einfluss auf limbische Funktionen (156). Insgesamt sind die psychiatrischen Nebenwirkungen der STN-THS also stark von der Mikrolage der Elektrode innerhalb des STN abhängig (157, 158). Für eine Elektrodenlage in zu enger Beziehung zum limbischen Subnukleus des STN ist bereits ein Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten psychiatrischer Symptome wie Apathie beschrieben (159, 160). Die effektivste Elektrodenlage innerhalb des STN befindet sich wohl in dessen lateraler anterodorsaler Subregion (121).

4.7 Ausblick

Es bedarf weiterer Forschung, um herauszufinden, in welcher Weise die STN-THS zu psychiatrischen Nebeneffekten führt. Es bleibt letztlich unklar, ob die gefundenen Effekte

durch eine direkte Beeinflussung des limbischen STN-Anteils oder durch akzidentielle Stimulation benachbarter Strukturen vermittelt werden. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen zum Einfluss der exakten Mikrolage der Elektrode, aber auch zur Auswirkung der Modifikation unterschiedlicher Stimulationsparameter (Pulsdauer, Intensität, Frequenz) notwendig.

Weiterhin wäre es wünschenswert eine höhere Gruppengröße zur Verfügung zu haben, um die statistische Aussagekraft zu erhöhen und diesbezüglich noch eine nicht-stimulierte 6-Wochen Kontrollgruppe mitzuführen.

Außerdem sollte in zukünftigen Versuchsdesigns eine differenziertere Darstellung der VTA Neurone erfolgen, um eine bessere Aussage über den Ursprung und die Funktionalität dieser Zellen und damit über die mögliche neurorestaurative Wirkung der THS zu erhalten. Dies ist mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern wie c-fos oder BrdU möglich, welche als Aktivitäts- bzw. Proliferationsmarker fungieren können. Insbesondere um eine Coexpression anderer klassischer Neurotransmitter mit Dopamin nachzuweisen müssten Mehrfachfärbungen mit bspw. GABA oder Glutamat erfolgen angefertigt werden.

Im Bereich der Verhaltenstests muss nach aussagekräftigeren Tests gesucht werden, um insbesondere das Angstverhalten der Tiere besser quantifizieren zu können. Dies ist nicht nur im Tiermodell, sondern auch beim Menschen eine Herausforderung.

5 Thesen

Die Tiefe Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* ist ein sicheres, etabliertes Verfahren in der Behandlung des Idiopathischen Parkinsonsyndroms, dessen exakte Wirkmechanismen allerdings weiterhin unklar sind.

Psychiatrische Nebeneffekte limitieren den Einsatz der Tiefen Hirnstimulation und sind stark abhängig von der genauen Lage der Elektrode.

Der *Nucleus subthalamicus* ist ein heterogenes Kerngebiet, dessen funktionelle Unterteilung noch zu wenig in der Zielfindung der optimalen Elektrodenlage und der dadurch ausgelösten Effekte berücksichtigt wird.

Die Tiefe Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* verbessert effektiv motorische Symptome von Patienten mit Idiopathischem Parkinsonsyndrom

Die Tiefe Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* ist im Parkinson-Tiermodell in der Lage, über neurorestaurative Effekte krankheitsmodifizierend zu wirken und ein früherer Einsatz im Krankheitsverlauf sollte erwogen werden.

Neurorestaurative Effekte haben nicht nur einen Einfluss auf die Motorik, sondern können auch Verhaltensänderungen herbeiführen.

Die durch die Tiefe Hirnstimulation des *Nucleus subthalamicus* ausgelösten psychiatrischen Nebenwirkungen können im Parkinson-Tiermodell durch angestoßene neurorestaurative Effekte neutralisiert werden.

Durch weitere Miniaturisierung und Verbesserung der Spannungsfelder der Elektroden können zukünftig unerwünschte Stimulationen benachbarter Kerngebiete oder funktionell unterschiedlicher Subnuclei des STN vermieden und dadurch die Wirksamkeit und Verträglichkeit der THS gesteigert und mögliche restaurative Effekte optimiert werden.

6 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Alexander Storch für die Vergabe des Promotionsthemas, die exzellente wissenschaftliche Betreuung und fruchtbare Diskussion der Ergebnisse sowie Bereitstellung der Arbeitsmaterialien bedanken. Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Kathrin Badstübner-Meeske, welche mir intensiv während des gesamten Prozesses zur Seite stand und durch deren Experimente im Vorfeld diese Arbeit überhaupt erst möglich wurde.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Oliver Schmitt für seine professionelle theoretische und praktische Betreuung im Rahmen der stereologischen Auswertung und Herrn Dr. rer. nat. Hawlitschka für die Einweisung im Umgang mit dem Kryostaten.

Den technischen Angestellten Frau Alfen und Frau Naumann danke ich für ihre gründliche Arbeit und die nette Zusammenarbeit.

7 Literatur

1. BADSTUEBNER, K., U. GIMSA, I. WEBER, A. TUCHSCHERER und J. GIMSA. Deep Brain Stimulation of Hemiparkinsonian Rats with Unipolar and Bipolar Electrodes for up to 6 Weeks: Behavioral Testing of Freely Moving Animals [online]. *Parkinson's disease*, 2017, **2017**, 5693589. ISSN 2090-8083. Verfügbar unter: doi:10.1155/2017/5693589
2. GOETZ, C.G., T.A. CHMURA und D.J. LANSKA. History of movement disorders as a neurological specialty. Part 14 of the MDS-sponsored History of Movement Disorders exhibit, Barcelona, June 2000. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2001, **16**(5), 954-959.
3. RIJK, M.C. de, L.J. LAUNER, K. BERGER, M.M. BRETELER, J.F. DARTIGUES, M. BALDERESCHI, L. FRATIGLIONI, A. LOBO, J. MARTINEZ-LAGE, C. TRENKWALDER und A. HOFMAN. Prevalence of Parkinson's disease in Europe. A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*, 2000, **54**(11 Suppl 5), S21-3.
4. MIGLIORE, L., COPPEDE, F., 2009. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases.
5. TAN, E.-K., C. TAN, S.M.C. FOOK-CHONG, S.Y. LUM, A. CHAI, H. CHUNG, H. SHEN, Y. ZHAO, M.L. TEOH, Y. YIH, R. PAVANNI, V.R. CHANDRAN und M.C. WONG. Dose-dependent protective effect of coffee, tea, and smoking in Parkinson's disease. A study in ethnic Chinese. *Journal of the neurological sciences*, 2003, **216**(1), 163-167.
6. HARDY, J. Genetic analysis of pathways to Parkinson disease [online]. *Neuron*, 2010, **68**(2), 201-206. ISSN 1097-4199. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.neuron.2010.10.014
7. WEINTRAUB, D., T. SIMUNI, C. CASPELL-GARCIA, C. COFFEY, S. LASCH, A. SIDEROWF, D. AARSLAND, P. BARONE, D. BURN, L.M. CHAHINE, J. EBERLING, A.J. ESPAY, E.D. FOSTER, J.B. LEVERENZ, I. LITVAN, I. RICHARD, M.D. TROYER und K.A. HAWKINS. Cognitive performance and neuropsychiatric symptoms in early, untreated Parkinson's disease [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2015, **30**(7), 919-927. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.26170
8. PONT-SUNYER, C., A. HOTTER, C. GAIG, K. SEPPI, Y. COMPTA, R. KATZENSCHLAGER, N. MAS, D. HOFENEDER, T. BRÜCKE, A. BAYÉS, K. WENZEL, J. INFANTE, H. ZACH, W. PIRKER, I.J. POSADA, R. ÁLVAREZ, L. ISPIERTO, O. de FÀBREGUES, A. CALLÉN, A. PALASÍ, M. AGUILAR, M.J. MARTÍ, F. VALLDEORIOLA, M. SALAMERO, W. POEWE und E. TOLOSA. The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD

- study) [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2015, **30**(2), 229-237. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.26077
9. SCHENCK, C.H., B.F. BOEVE und M.W. MAHOWALD. Delayed emergence of a parkinsonian disorder or dementia in 81% of older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder [online]. A 16-year update on a previously reported series. *Sleep medicine*, 2013, **14**(8), 744-748. ISSN 1878-5506. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.sleep.2012.10.009
 10. TITOVA, N., C. PADMAKUMAR, S.J.G. LEWIS und K.R. CHAUDHURI. Parkinson's [online]. A syndrome rather than a disease? *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 2017, **124**(8), 907-914. ISSN 1435-1463. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00702-016-1667-6.+
 11. LANGSTON, J.W. The Parkinson's complex [online]. Parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Annals of neurology*, 2006, **59**(4), 591-596. ISSN 0364-5134. Verfügbar unter: doi:10.1002/ana.20834
 12. MU, J., K.R. CHAUDHURI, C. BIELZA, J. de PEDRO-CUESTA, P. LARRAÑAGA und P. MARTINEZ-MARTIN. Parkinson's Disease Subtypes Identified from Cluster Analysis of Motor and Non-motor Symptoms [online]. *Frontiers in aging neuroscience*, 2017, **9**, 301. ISSN 1663-4365. Verfügbar unter: doi:10.3389/fnagi.2017.00301
 13. BRAAK, H., U. RÜB, E.N.H. JANSEN STEUR, K. DEL TREDICI und R.A.I. de VOS. Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease [online]. *Neurology*, 2005, **64**(8), 1404-1410. ISSN 0028-3878. Verfügbar unter: doi:10.1212/01.WNL.0000158422.41380.82
 14. HALLIDAY, G., A. LEES und M. STERN. Milestones in Parkinson's disease--clinical and pathologic features [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2011, **26**(6), 1015-1021. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.23669
 15. MARRAS, C. und K.R. CHAUDHURI. Nonmotor features of Parkinson's disease subtypes [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2016, **31**(8), 1095-1102. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.26510
 16. SULZER, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease [online]. *Trends in neurosciences*, 2007, **30**(5), 244-250. ISSN 0166-2236. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.tins.2007.03.009

17. BRAAK, H., U. RÜB, W.P. GAI und K. DEL TREDICI. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen [online]. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 2003, **110**(5), 517-536. ISSN 1435-1463. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00702-002-0808-2
18. JENNER P1. Oxidative stress in Parkinson's disease.
19. HENCHCLIFFE, C. und M.F. BEAL. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis [online]. *Nature clinical practice. Neurology*, 2008, **4**(11), 600-609. ISSN 1745-8358. Verfügbar unter: doi:10.1038/ncpneuro0924
20. SCHEPERJANS, F., V. AHO, P.A.B. PEREIRA, K. KOSKINEN, L. PAULIN, E. PEKKONEN, E. HAAPANIEMI, S. KAAKKOLA, J. EEROLA-RAUTIO, M. POHJA, E. KINNUNEN, K. MURROS und P. AUVINEN. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2015, **30**(3), 350-358. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.26069
21. MULAK, A. und B. BONAZ. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease [online]. *World journal of gastroenterology*, 2015, **21**(37), 10609-10620. ISSN 2219-2840. Verfügbar unter: doi:10.3748/wjg.v21.i37.10609
22. CABIN, D.E., K. SHIMAZU, D. MURPHY, N.B. COLE, W. GOTTSCHALK, K.L. MCILWAIN, B. ORRISON, A. CHEN, C.E. ELLIS, R. PAYLOR, B. LU und R.L. NUSSBAUM. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2002, **22**(20), 8797-8807.
23. BURRÉ, J., M. SHARMA, T. TSETSENIS, V. BUCHMAN, M.R. ETHERTON und T.C. SÜDHOF. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro [online]. *Science*, 2010, **329**(5999), 1663-1667. Verfügbar unter: doi:10.1126/science.1195227
24. POLYMERPOULOS, M.H., C. LAVEDAN, E. LEROY, S.E. IDE, A. DEHEJIA, A. DUTRA, B. PIKE, H. ROOT, J. RUBENSTEIN, R. BOYER, E.S. STENROOS, S. CHANDRASEKHARAPPA, A. ATHANASSIADOU, T. PAPAPETROPOULOS, W.G. JOHNSON, A.M. LAZZARINI, R.C. DUVOISIN, G. DI IORIO, L.I. GOLBE und R.L. NUSSBAUM. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 1997, **276**(5321), 2045-2047.
25. OLANOW, C.W. und S.B. PRUSINER. Is Parkinson's disease a prion disorder? [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

- 2009, **106**(31), 12571-12572. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.0906759106
26. BENABID, A.L., P. POLLAK, A. LOUVEAU, S. HENRY und J. de ROUGEMONT. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Applied neurophysiology*, 1987, **50**(1-6), 344-346.
 27. BENABID, A.L., P. POLLAK, C. GERVASON, D. HOFFMANN, D.M. GAO, M. HOMMEL, J.E. PERRET und J. de ROUGEMONT. Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet (London, England)*, 1991, **337**(8738), 403-406.
 28. AZIZ, T.Z., D. PEGGS, M.A. SAMBROOK und A.R. CROSSMAN. Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 1991, **6**(4), 288-292. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.870060404
 29. BERGMAN, H., T. WICHMANN und M.R. DELONG. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science (New York, N.Y.)*, 1990, **249**(4975), 1436-1438.
 30. POLLAK, P., A.L. BENABID, C. GROSS, D.M. GAO, A. LAURENT, A. BENAZZOUZ, D. HOFFMANN, M. GENTIL und J. PERRET. Effets de la stimulation du noyau sous-thalamique dans la maladie de Parkinson. *Revue neurologique*, 1993, **149**(3), 175-176.
 31. BENAZZOUZ, A., C. GROSS, J. FÉGER, T. BORAUD und B. BIOULAC. Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *The European journal of neuroscience*, 1993, **5**(4), 382-389.
 32. LIMOUSIN, P., P. POLLAK, A. BENAZZOUZ, D. HOFFMANN, J.F. LE BAS, E. BROUSOLLE, J.E. PERRET und A.L. BENABID. Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet (London, England)*, 1995, **345**(8942), 91-95.
 33. DAMS, J., M. BALZER-GELDSETZER, U. SIEBERT, G. DEUSCHL, W.M.M. SCHUEPBACH, P. KRACK, L. TIMMERMAN, A. SCHNITZLER, J.-P. REESE und R. DODEL. Cost-effectiveness of neurostimulation in Parkinson's disease with early motor complications [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2016, **31**(8), 1183-1191. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.26740

34. PARENT, M. und A. PARENT. The pallidofugal motor fiber system in primates [online]. *Parkinsonism & related disorders*, 2004, **10**(4), 203-211. ISSN 1353-8020. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.parkreldis.2004.02.007
35. HAMANI, C., J.A. SAINT-CYR, J. FRASER, M. KAPLITT und A.M. LOZANO. The subthalamic nucleus in the context of movement disorders [online]. *Brain : a journal of neurology*, 2004, **127**(Pt 1), 4-20. Verfügbar unter: doi:10.1093/brain/awh029
36. LÉVESQUE, J.-C. und A. PARENT. GABAergic interneurons in human subthalamic nucleus [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2005, **20**(5), 574-584. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.20374
37. SMITH, Y., L.N. HAZRATI und A. PARENT. Efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as studied by the PHA-L anterograde tracing method [online]. *The journal of comparative Neurology*, 1990, **294**(2), 306-323. Verfügbar unter: doi:10.1002/cne.902940213
38. PARENT, M., M.-J. WALLMAN, D. GAGNON und A. PARENT. Serotonin innervation of basal ganglia in monkeys and humans [online]. *Journal of chemical neuroanatomy*, 2011, **41**(4), 256-265. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jchemneu.2011.04.005
39. FRANÇOIS, C., C. SAVY, C. JAN, D. TANDE, E.C. HIRSCH und J. YELNIK. Dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the normal state, in MPTP-treated monkeys, and in Parkinson's disease patients. *The journal of comparative Neurology*, 2000, **425**(1), 121-129.
40. PARENT, A. und L.N. HAZRATI. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain research. Brain research reviews*, 1995, **20**(1), 128-154.
41. ALEXANDER, G.E., M.D. CRUTCHER und M.R. DELONG. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Progress in brain research*, 1990, **85**, 119-146.
42. MAGARIÑOS-ASCONE, C., J.H. PAZO, O. MACADAR und W. BUÑO. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus silences subthalamic neurons. A possible cellular mechanism in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2002, **115**(4), 1109-1117.
43. SHIN, D.S., M. SAMOILOVA, M. COTIC, L. ZHANG, J.M. BROTHIE und P.L. CARLEN. High frequency stimulation or elevated K⁺ depresses neuronal activity in the rat entopeduncular nucleus [online]. *Neuroscience*, 2007, **149**(1), 68-86. ISSN 0306-4522. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.neuroscience.2007.06.055
44. DOSTROVSKY, J.O., R. LEVY, J.P. WU, W.D. HUTCHISON, R.R. TASKER und A.M. LOZANO. Microstimulation-induced inhibition of neuronal firing in human globus

- pallidus [online]. *Journal of neurophysiology*, 2000, **84**(1), 570-574. ISSN 0022-3077. Verfügbar unter: doi:10.1152/jn.2000.84.1.570
45. TAI, C.-H., T. BORAUD, E. BEZARD, B. BIOULAC, C. GROSS und A. BENAZZOUZ. Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridles neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata [online]. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2003, **17**(13), 1820-1830. ISSN 1530-6860. Verfügbar unter: doi:10.1096/fj.03-0163com
 46. HAMANI, C., G. FLORENCE, H. HEINSEN, B.R. PLANTINGA, Y. TEMEL, K. ULUDAG, E. ALHO, M.J. TEIXEIRA, E. AMARO und E.T. FONOFF. Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation: Basic Concepts and Novel Perspectives [online]. *eNeuro*, 2017, **4**(5). Verfügbar unter: doi:10.1523/ENEURO.0140-17.2017
 47. ZSIGMOND, P., N. DERNROTH, A. KULLMAN, L.-E. AUGUSTINSSON und N. DIZDAR. Stereotactic microdialysis of the basal ganglia in Parkinson's disease [online]. *Journal of neuroscience methods*, 2012, **207**(1), 17-22. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jneumeth.2012.02.021
 48. BROWN, P., P. MAZZONE, A. OLIVIERO, M.G. ALTIBRANDI, F. PILATO, P.A. TONALI und V. DI LAZZARO. Effects of stimulation of the subthalamic area on oscillatory pallidal activity in Parkinson's disease [online]. *Experimental Neurology*, 2004, **188**(2), 480-490. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.expneurol.2004.05.009
 49. CHEN, C.C., V. LITVAK, T. GILBERTSON, A. KÜHN, C.S. LU, S.T. LEE, C.H. TSAI, S. TISCH, P. LIMOUSIN, M. HARIZ und P. BROWN. Excessive synchronization of basal ganglia neurons at 20 Hz slows movement in Parkinson's disease [online]. *Experimental Neurology*, 2007, **205**(1), 214-221. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.expneurol.2007.01.027
 50. DIRKX, M.F., H. DEN OUDEN, E. AARTS, M. TIMMER, B.R. BLOEM, I. TONI und R.C. HELMICH. The Cerebral Network of Parkinson's Tremor [online]. An Effective Connectivity fMRI Study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2016, **36**(19), 5362-5372. ISSN 1529-2401. Verfügbar unter: doi:10.1523/JNEUROSCI.3634-15.2016
 51. HELMICH, R.C., M. HALLETT, G. DEUSCHL, I. TONI und B.R. BLOEM. Cerebral causes and consequences of parkinsonian resting tremor [online]. A tale of two circuits? *Brain : a journal of neurology*, 2012, **135**(Pt 11), 3206-3226. Verfügbar unter: doi:10.1093/brain/aws023.

52. CHUNG, S.J., S.R. JEON, S.R. KIM, Y.H. SUNG und M.C. LEE. Bilateral effects of unilateral subthalamic nucleus deep brain stimulation in advanced Parkinson's disease [online]. *European neurology*, 2006, **56**(2), 127-132. ISSN 0014-3022. Verfügbar unter: doi:10.1159/000095704
53. RIZZONE, M.G., A. FASANO, A. DANIELE, M. ZIBETTI, A. MEROLA, L. RIZZI, C. PIANO, C. PICCININNI, L.M. ROMITO, L. LOPIANO und A. ALBANESE. Long-term outcome of subthalamic nucleus DBS in Parkinson's disease: from the advanced phase towards the late stage of the disease? [online]. *Parkinsonism & related disorders*, 2014, **20**(4), 376-381. ISSN 1353-8020. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.parkreldis.2014.01.012
54. KLEINER-FISMAN, G., D.N. FISMAN, E. SIME, J.A. SAINT-CYR, A.M. LOZANO und A.E. LANG. Long-term follow up of bilateral deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in patients with advanced Parkinson disease [online]. *Journal of neurosurgery*, 2003, **99**(3), 489-495. Verfügbar unter: doi:10.3171/jns.2003.99.3.0489
55. THS in Australien Klinischer Status Review 2016.
56. PIBOOLNURAK, P., A.E. LANG, A.M. LOZANO, J.M. MIYASAKI, J.A. SAINT-CYR, Y.-Y.W. POON, W.D. HUTCHISON, J.O. DOSTROVSKY und E. MORO. Levodopa response in long-term bilateral subthalamic stimulation for Parkinson's disease [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2007, **22**(7), 990-997. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.21482
57. BLAHAK, C., H. BÄZNER, H.-H. CAPELLE, J.C. WÖHRLE, R. WEIGEL, M.G. HENNERICI und J.K. KRAUSS. Rapid response of parkinsonian tremor to STN-DBS changes [online]. Direct modulation of oscillatory basal ganglia activity? *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2009, **24**(8), 1221-1225. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.22536
58. BALE, F., J.F. ROULAND und P. CASTIER. Manifestations ophtalmologiques révélatrices d'une forme fruste de maladie de Recklinghausen. *Presse medicale (Paris, France : 1983)*, 1989, **18**(19), 972-974.
59. AGNESI, F., M.D. JOHNSON und J.L. VITEK. Deep brain stimulation [online]. How does it work? *Handbook of clinical neurology*, 2013, **116**, 39-54. ISSN 0072-9752. Verfügbar unter: doi:10.1016/B978-0-444-53497-2.00004-8
60. FASANO, A., C.C. AQUINO, J.K. KRAUSS, C.R. HONEY und B.R. BLOEM. Axial disability and deep brain stimulation in patients with Parkinson disease [online]. *Nature reviews. Neurology*, 2015, **11**(2), 98-110. ISSN 1759-4766. Verfügbar unter: doi:10.1038/nrneurol.2014.252

61. SCHUEPBACH, W.M.M., J. RAU, K. KNUDSEN, J. VOLKMANN, P. KRACK, L. TIMMERMANN, T.D. HÄLBIG, H. HESEKAMP, S.M. NAVARRO, N. MEIER, D. FALK, M. MEHDORN, S. PASCHEN, M. MAAROUF, M.T. BARBE, G.R. FINK, A. KUPSCH, D. GRUBER, G.-H. SCHNEIDER, E. SEIGNEURET, A. KISTNER, P. CHAYNES, F. ORY-MAGNE, C. BREFEL COURBON, J. VESPER, A. SCHNITZLER, L. WOJTECKI, J.-L. HOUETO, B. BATAILLE, D. MALTÊTE, P. DAMIER, S. RAOUL, F. SIXEL-DOERING, D. HELLWIG, A. GHARABAGHI, R. KRÜGER, M.O. PINSKER, F. AMTAGE, J.-M. RÉGIS, T. WITJAS, S. THOBOIS, P. MERTENS, M. KLOSS, A. HARTMANN, W.H. OERTEL, B. POST, H. SPEELMAN, Y. AGID, C. SCHADE-BRITTINGER und G. DEUSCHL. Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications [online]. *The New England journal of medicine*, 2013, **368**(7), 610-622. ISSN 0028-4793. Verfügbar unter: doi:10.1056/NEJMoa1205158
62. PINSKER, M., F. AMTAGE, M. BERGER, G. NIKKHAH und L.T. VAN ELST. Psychiatric side-effects of bilateral deep brain stimulation for movement disorders [online]. *Acta neurochirurgica. Supplement*, 2013, **117**, 47-51. ISSN 0065-1419. Verfügbar unter: doi:10.1007/978-3-7091-1482-7_8
63. CASTELLI, L., P. PEROZZO, M. ZIBETTI, B. CRIVELLI, U. MORABITO, M. LANOTTE, F. COSSA, B. BERGAMASCO und L. LOPIANO. Chronic deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for Parkinson's disease [online]. Effects on cognition, mood, anxiety and personality traits. *European neurology*, 2006, **55**(3), 136-144. ISSN 0014-3022. Verfügbar unter: doi:10.1159/000093213
64. FUNKIEWIEZ, A., C. ARDOUIN, P. KRACK, V. FRAIX, N. VAN BLERCOM, J. XIE, E. MORO, A.-L. BENABID und P. POLLAK. Acute psychotropic effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation and levodopa in Parkinson's disease [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2003, **18**(5), 524-530. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.10441
65. PILLON, B., C. ARDOUIN, P. DAMIER, P. KRACK, J.L. HOUETO, H. KLINGER, A.M. BONNET, P. POLLAK, A.L. BENABID und Y. AGID. Neuropsychological changes between "off" and "on" STN or GPi stimulation in Parkinson's disease. *Neurology*, 2000, **55**(3), 411-418.
66. TRÖSTER, A.I., J.A. FIELDS, S. WILKINSON, R. PAHWA, W.C. KOLLER und K.E. LYONS. Effect of motor improvement on quality of life following subthalamic stimulation is mediated by changes in depressive symptomatology [online]. *Stereotactic and functional neurosurgery*, 2003, **80**(1-4), 43-47. ISSN 1011-6125. Verfügbar unter: doi:10.1159/000075159

67. PEROZZO, P., M. RIZZONE, B. BERGAMASCO, L. CASTELLI, M. LANOTTE, A. TAVELLA, E. TORRE und L. LOPIANO. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: comparison of pre- and postoperative neuropsychological evaluation. *Journal of the neurological sciences*, 2001, **192**(1-2), 9-15.
68. BRUSA, L., M. PIERANTOZZI, A. PEPPE, M.G. ALTIBRANDI, P. GIACOMINI, P. MAZZONE und P. STANZIONE. Deep brain stimulation (DBS) attentional effects parallel those of l-dopa treatment [online]. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 2001, **108**(8-9), 1021-1027. ISSN 1435-1463. Verfügbar unter: doi:10.1007/s007020170020
69. MORRISON, C. Neuropsychological functioning following bilateral subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease [online]. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 2004, **19**(2), 165-181. ISSN 08876177. Verfügbar unter: doi:10.1016/S0887-6177(03)00004-0
70. HOUETO, J.L., V. MESNAGE, M.L. WELTER, L. MALLET, Y. AGID und B.P. BEJJANI. Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: two-year follow-up. *Neurology*, 2003, **60**(1), 154-5; author reply 154-5.
71. ØSTERGAARD, K., N. SUNDE und E. DUPONT. Effects of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in patients with severe Parkinson's disease and motor fluctuations [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2002, **17**(4), 693-700. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.10188
72. BERNEY, A., F. VINGERHOETS, A. PERRIN, P. GUÉX, J.-G. VILLEMURE, P.R. BURKHARD, C. BENKELFAT und J. GHIKA. Effect on mood of subthalamic DBS for Parkinson's disease: a consecutive series of 24 patients. *Neurology*, 2002, **59**(9), 1427-1429.
73. FIELDS, J., A. TROSTER, S. WOODS, C. HIGGINSON, S. WILKINSON, K. LYONS, W. KOLLER und R. PAHWA. Neuropsychological and quality of life outcomes 12 months after unilateral thalamic stimulation for essential tremor [online]. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2003, **74**(3), 305-311. Verfügbar unter: doi:10.1136/jnnp.74.3.305
74. MARTÍNEZ-MARTÍN, P., F. VALLDEORIOLA, E. TOLOSA, M. PILLERI, J.L. MOLINUEVO, J. RUMIÀ und E. FERRER. Bilateral subthalamic nucleus stimulation and quality of life in advanced Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2002, **17**(2), 372-377.
75. CASTELLI, L., P. PEROZZO, M.L. GENESIA, E. TORRE, M. PESARE, A. CINQUEPALMI, M. LANOTTE, B. BERGAMASCO und L. LOPIANO. Sexual well being in parkinsonian patients after deep brain stimulation of the subthalamic nucleus [online]. *Journal of*

- neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2004, **75**(9), 1260-1264. Verfügbar unter: doi:10.1136/jnnp.2003.034579
76. HOUETO, J., V. MESNAGE, L. MALLET, B. PILLON, M. GARGIULO, S.T. DU MONCEL, A. BONNET, B. PIDOUX, D. DORMONT, P. CORNU und Y. AGID. Behavioural disorders, Parkinson's disease and subthalamic stimulation [online]. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2002, **72**(6), 701-707. Verfügbar unter: doi:10.1136/jnnp.72.6.701
 77. BEJJANI, B.P., J.L. HOUETO, M. HARIZ, J. YELNIK, V. MESNAGE, A.M. BONNET, B. PIDOUX, D. DORMONT, P. CORNU und Y. AGID. Aggressive behavior induced by intraoperative stimulation in the triangle of Sano. *Neurology*, 2002, **59**(9), 1425-1427.
 78. OKUN, M., D. RAJU, B. WALTER, J. JUNCOS, M. DELONG, K. HEILMAN, W. MCDONALD und J. VITEK. Pseudobulbar crying induced by stimulation in the region of the subthalamic nucleus [online]. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2004, **75**(6), 921-923. Verfügbar unter: doi:10.1136/jnnp.2003.016485
 79. VARMA, T., S. FOX, P. ELDRIDGE, P. LITTLECHILD, P. BYRNE, A. FORSTER, A. MARSHALL, H. CAMERON, K. MCIVER, N. FLETCHER und M. STEIGER. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus: effectiveness in advanced Parkinson's disease patients previously reliant on apomorphine [online]. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2003, **74**(2), 170-174. Verfügbar unter: doi:10.1136/jnnp.74.2.170
 80. KULISEVSKY, J., M.L. BERTHIER, A. GIRONELL, B. PASCUAL-SEDANO, J. MOLET und P. PARÉS. Mania following deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Neurology*, 2002, **59**(9), 1421-1424.
 81. FUNKIEWIEZ, A., C. ARDOUIN, E. CAPUTO, P. KRACK, V. FRAIX, H. KLINGER, S. CHABARDES, K. FOOTE, A. BENABID und P. POLLAK. Long term effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation on cognitive function, mood, and behaviour in Parkinson's disease [online]. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2004, **75**(6), 834-839. Verfügbar unter: doi:10.1136/jnnp.2002.009803
 82. HARIZ, G.-M., M. LINDBERG, M.I. HARIZ und A.T. BERGENHEIM. Gender differences in disability and health-related quality of life in patients with Parkinson's disease treated with stereotactic surgery. *Acta neurologica Scandinavica*, 2003, **108**(1), 28-37.
 83. KRACK, P., BATIR, A., VAN BLERCOM, N., CHABARDES, S., FRAIX, V., ARDOUIN, C., KOUDSIE, A. Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease.

84. SAULEAU, P., F. LE JEUNE, S. DRAPIER, J.-F. HOUVENAGHEL, T. DONDAINE, C. HAEGELEN, F. LALYS, G. ROBERT, D. DRAPIER und M. VÉRIN. Weight gain following subthalamic nucleus deep brain stimulation: a PET study [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2014, **29**(14), 1781-1787. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.26063
85. DEUSCHL, G., J. HERZOG, G. KLEINER-FISMAN, C. KUBU, A.M. LOZANO, K.E. LYONS, M.C. RODRIGUEZ-OROZ, F. TAMMA, A.I. TRÖSTER, J.L. VITEK, J. VOLKMANN und V. VOON. Deep brain stimulation: postoperative issues [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2006, **21 Suppl 14**, S219-37. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.20957
86. DAFSARI, H.S., P. REDDY, C. HERCHENBACH, S. WAWRO, J.N. PETRY-SCHMELZER, V. VISSER-VANDEWALLE, A. RIZOS, M. SILVERDALE, K. ASHKAN, M. SAMUEL, J. EVANS, C.A. HUBER, G.R. FINK, A. ANTONINI, K.R. CHAUDHURI, P. MARTINEZ-MARTIN und L. TIMMERMAN. Beneficial Effects of Bilateral Subthalamic Stimulation on Non-Motor Symptoms in Parkinson's Disease [online]. *Brain stimulation*, 2016, **9**(1), 78-85. ISSN 1876-4754. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.brs.2015.08.005
87. ROSIN, B., M. SLOVIK, R. MITELMAN, M. RIVLIN-ETZION, S.N. HABER, Z. ISRAEL, E. VAADIA und H. BERGMAN. Closed-loop deep brain stimulation is superior in ameliorating parkinsonism [online]. *Neuron*, 2011, **72**(2), 370-384. ISSN 1097-4199. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.neuron.2011.08.023
88. BEAL, M.F. Parkinson's disease: a model dilemma [online]. *Nature*, 2010, **466**(7310), S8-10. Verfügbar unter: doi:10.1038/466S8a
89. LANGSTON, J.W. The MPTP Story [online]. *Journal of Parkinson's disease*, 2017, **7**(s1), S11-S19. Verfügbar unter: doi:10.3233/JPD-179006
90. BLOEM, B.R., I. IRWIN, O.J. BURUMA, J. HAAN, R.A. ROOS, J.W. TETRUD und J.W. LANGSTON. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*, 1990, **97**(2-3), 273-293.
91. BURNS, R.S., C.C. CHIUEH, S.P. MARKEY, M.H. EBERT, D.M. JACOBOWITZ und I.J. KOPIN. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983, **80**(14), 4546-4550.

92. BETARBET, R., T.B. SHERER, G. MACKENZIE, M. GARCIA-OSUNA, A.V. PANOV und J.T. GREENAMYRE. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease [online]. *Nature neuroscience*, 2000, **3**(12), 1301-1306. ISSN 1097-6256. Verfügbar unter: doi:10.1038/81834
93. FEANY, M.B. und W.W. BENDER. A Drosophila model of Parkinson's disease [online]. *Nature*, 2000, **404**(6776), 394-398. Verfügbar unter: doi:10.1038/35006074
94. MASLIAH, E., E. ROCKENSTEIN, I. VEINBERGS, M. MALLORY, M. HASHIMOTO, A. TAKEDA, Y. SAGARA, A. SISK und L. MUCKE. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science (New York, N.Y.)*, 2000, **287**(5456), 1265-1269.
95. RODRIGUEZ-PALLARES, J., J.A. PARGA, A. MUÑOZ, P. REY, M.J. GUERRA und J.L. LABANDEIRA-GARCIA. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons [online]. *Journal of neurochemistry*, 2007, **103**(1), 145-156. Verfügbar unter: doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04699.x
96. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T., P. BARROSO-CHINEA, I. de LA CRUZ MUROS, M. DEL MAR PÉREZ-DELGADO und M. RODRÍGUEZ. Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons [online]. *The journal of comparative Neurology*, 2004, **479**(2), 198-215. Verfügbar unter: doi:10.1002/cne.20323
97. MA, Y., M. ZHAN, L. OUYANG, Y. LI, S. CHEN, J. WU, J. CHEN, C. LUO und W. LEI. The effects of unilateral 6-OHDA lesion in medial forebrain bundle on the motor, cognitive dysfunctions and vulnerability of different striatal interneuron types in rats [online]. *Behavioural brain research*, 2014, **266**, 37-45. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.bbr.2014.02.039
98. SÁNCHEZ-IGLESIAS, S., P. REY, E. MÉNDEZ-ALVAREZ, J.L. LABANDEIRA-GARCÍA und R. SOTO-OTERO. Time-course of brain oxidative damage caused by intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in a rat model of Parkinson's disease [online]. *Neurochemical research*, 2007, **32**(1), 99-105. ISSN 0364-3190. Verfügbar unter: doi:10.1007/s11064-006-9232-6
99. LEE, C.S., H. SAUER und A. BJORKLUND. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neuroscience*, 1996, **72**(3), 641-653.

100. SAUER, H. und W.H. OERTEL. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, 1994, **59**(2), 401-415.
101. YUAN, H., S. SARRE, G. EBINGER und Y. MICHOTTE. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease [online]. *Journal of neuroscience methods*, 2005, **144**(1), 35-45. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jneumeth.2004.10.004
102. BADSTUEBNER, K., M. STUBBE, T. KROEGER, E. MIX und J. GIMSA. Impedance detection of the electrical resistivity of the wound tissue around deep brain stimulation electrodes permits registration of the encapsulation process in a rat model [online]. *Journal of Electrical Bioimpedance*, 2017, **8**(1), 11. Verfügbar unter: doi:10.5617/jeb.4086
103. PAXINOS, G. AND WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Sixth Edition: Hard Cover Edition (Amsterdam; Boston: Academic Press)*.
104. HALL, C.S., AND BALLACHEY, E.L. (1932. *A Study of the Rat's Behavior in a Field: A Contribution to Method in Comparative Psychology (University of California Press)*.
105. SEIBENHENER, M.L. und M.C. WOOTEN. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice [online]. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2015, (96), e52434. Verfügbar unter: doi:10.3791/52434
106. CHOLERIS, E., A.W. THOMAS, M. KAVALIERS und F.S. PRATO. A detailed ethological analysis of the mouse open field test. Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 2001, **25**(3), 235-260.
107. OLSSON, M., G. NIKKHAH, C. BENTLAGE und A. BJÖRKLUND. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model. Differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 1995, **15**(5 Pt 2), 3863-3875.
108. GUNDERSEN, H.J. und R. OSTERBY. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology. Or 'do more less well!'. *Journal of microscopy*, 1981, **121**(Pt 1), 65-73.
109. GUNDERSEN, H.J. und E.B. JENSEN. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of microscopy*, 1987, **147**(Pt 3), 229-263.

110. SCHMITZ, C. und P.R. HOF. Design-based stereology in neuroscience [online]. *Neuroscience*, 2005, **130**(4), 813-831. ISSN 0306-4522. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.neuroscience.2004.08.050
111. WEST, M.J., L. SLOMIANKA und H.J. GUNDERSEN. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator [online]. *The Anatomical record*, 1991, **231**(4), 482-497. Verfügbar unter: doi:10.1002/ar.1092310411
112. KEUKER, J.I., G.K. VOLLMANN-HONSDORF und E. FUCHS. How to use the optical fractionator. An example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews. *Brain research. Brain research protocols*, 2001, **7**(3), 211-221.
113. GUNDERSEN, H.J., T.F. BENDTSEN, L. KORBO, N. MARCUSSEN, A. MØLLER, K. NIELSEN, J.R. NYENGAARD, B. PAKKENBERG, F.B. SØRENSEN und A. VESTERBY. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 1988, **96**(5), 379-394.
114. GUNDERSEN, H.J. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *Journal of microscopy*, 1986, **143**(Pt 1), 3-45.
115. MCRITCHIE, D.A., C.D. HARDMAN und G.M. HALLIDAY. Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans [online]. *The journal of comparative Neurology*, 1996, **364**(1), 121-150. Verfügbar unter: doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960101)364:1<121::AID-CNE11>3.0.CO;2-1
116. TASS, P.A., L. QIN, C. HAUPTMANN, S. DOVERO, E. BEZARD, T. BORAUD und W.G. MEISSNER. The translational value of the MPTP non-human primate model of Parkinsonism for deep brain stimulation research [online]. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, 2011, **2011**, 663-666. ISSN 1557-170X. Verfügbar unter: doi:10.1109/IEMBS.2011.6090148
117. VOLKMANN, J., C. DANIELS und K. WITT. Neuropsychiatric effects of subthalamic neurostimulation in Parkinson disease [online]. *Nature reviews. Neurology*, 2010, **6**(9), 487-498. ISSN 1759-4766. Verfügbar unter: doi:10.1038/nrneurol.2010.111

118. VOLKMANN, J., N. ALLERT, J. VOGES, P.H. WEISS, H.J. FREUND und V. STURM. Safety and efficacy of pallidal or subthalamic nucleus stimulation in advanced PD. *Neurology*, 2001, **56**(4), 548-551.
119. ROMANELLI, P., G. HEIT, B.C. HILL, A. KRAUS, T. HASTIE und H.M. BRONTÉ-STEWART. Microelectrode recording revealing a somatotopic body map in the subthalamic nucleus in humans with Parkinson disease [online]. *Journal of neurosurgery*, 2004, **100**(4), 611-618. Verfügbar unter: doi:10.3171/jns.2004.100.4.0611
120. PARENT, A. und L.N. HAZRATI. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain research. Brain research reviews*, 1995, **20**(1), 91-127.
121. NOWINSKI, W.L., D. BELOV, P. POLLAK und A.-L. BENABID. Statistical analysis of 168 bilateral subthalamic nucleus implantations by means of the probabilistic functional atlas. *Neurosurgery*, 2005, **57**(4 Suppl), 319-30; discussion 319-30.
122. WALLACE, B.A., K. ASHKAN, C.E. HEISE, K.D. FOOTE, N. TORRES, J. MITROFANIS und A.-L. BENABID. Survival of midbrain dopaminergic cells after lesion or deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated monkeys [online]. *Brain : a journal of neurology*, 2007, **130**(Pt 8), 2129-2145. Verfügbar unter: doi:10.1093/brain/awm137
123. MAESAWA, S., Y. KANEOKE, Y. KAJITA, N. USUI, N. MISAWA, A. NAKAYAMA und J. YOSHIDA. Long-term stimulation of the subthalamic nucleus in hemiparkinsonian rats: neuroprotection of dopaminergic neurons [online]. *Journal of neurosurgery*, 2004, **100**(4), 679-687. Verfügbar unter: doi:10.3171/jns.2004.100.4.0679
124. PAUL, G., W. MEISSNER, S. REIN, D. HARNACK, C. WINTER, K. HOSMANN, R. MORGENSTERN und A. KUPSCH. Ablation of the subthalamic nucleus protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 2004, **185**(2), 272-280.
125. TEMEL, Y., V. VISSER-VANDEWALLE, S. KAPLAN, R. KOZAN, M.A.R.C. DAEMEN, A. BLOKLAND, C. SCHMITZ und H.W.M. STEINBUSCH. Protection of nigral cell death by bilateral subthalamic nucleus stimulation [online]. *Brain research*, 2006, **1120**(1), 100-105. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.brainres.2006.08.082
126. ZHAO, M., S. MOMMA, K. DELFANI, M. CARLEN, R.M. CASSIDY, C.B. JOHANSSON, H. BRISMAR, O. SHUPLIAKOV, J. FRISEN und A.M. JANSON. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, **100**(13), 7925-7930. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.1131955100

127. YOSHIMI, K., Y.-R. REN, T. SEKI, M. YAMADA, H. OOIZUMI, M. ONODERA, Y. SAITO, S. MURAYAMA, H. OKANO, Y. MIZUNO und H. MOCHIZUKI. Possibility for neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain [online]. *Annals of neurology*, 2005, **58**(1), 31-40. ISSN 0364-5134. Verfügbar unter: doi:10.1002/ana.20506
128. STONE, S.S.D., C.M. TEIXEIRA, L.M. DEVITO, K. ZASLAVSKY, S.A. JOSSELYN, A.M. LOZANO und P.W. FRANKLAND. Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory [online]. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2011, **31**(38), 13469-13484. ISSN 1529-2401. Verfügbar unter: doi:10.1523/JNEUROSCI.3100-11.2011
129. HAMANI, C., S.S. STONE, A. GARTEN, A.M. LOZANO und G. WINOCUR. Memory rescue and enhanced neurogenesis following electrical stimulation of the anterior thalamus in rats treated with corticosterone [online]. *Experimental Neurology*, 2011, **232**(1), 100-104. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.expneurol.2011.08.023
130. FRIELINGSDORF, H., K. SCHWARZ, P. BRUNDIN und P. MOHAPEL. No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**(27), 10177-10182. ISSN 0027-8424. Verfügbar unter: doi:10.1073/pnas.0401229101
131. DULCIS, D., P. JAMSHIDI, S. LEUTGEB und N.C. SPITZER. Neurotransmitter switching in the adult brain regulates behavior [online]. *Science*, 2013, **340**(6131), 449-453. Verfügbar unter: doi:10.1126/science.1234152
132. JAHANSHAHI, A., R. VLAMINGS, W.M.C. VAN ROON-MOM, R.L.M. FAULL, H.J. WALDVOGEL, M.L.F. JANSSEN, Y. YAKKIOUI, D.H. ZEEF, E. KOCABICAK, H.W.M. STEINBUSCH und Y. TEMEL. Changes in brainstem serotonergic and dopaminergic cell populations in experimental and clinical Huntington's disease [online]. *Neuroscience*, 2013, **238**, 71-81. ISSN 0306-4522. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.neuroscience.2013.01.071
133. AUMANN, T.D., K. EGAN, J. LIM, W.C. BOON, C.R. BYE, H.K. CHUA, N. BABAN, C.L. PARISH, L. BOBROVSKAYA, P. DICKSON und M.K. HORNE. Neuronal activity regulates expression of tyrosine hydroxylase in adult mouse substantia nigra pars compacta neurons [online]. *Journal of neurochemistry*, 2011, **116**(4), 646-658. Verfügbar unter: doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07151.x
134. AUMANN, T.D., D. TOMAS und M.K. HORNE. Environmental and behavioral modulation of the number of substantia nigra dopamine neurons in adult mice [online].

- Brain and behavior*, 2013, **3**(6), 617-625. ISSN 2162-3279. Verfügbar unter: doi:10.1002/brb3.163
135. AUMANN, T.D. Environment- and activity-dependent dopamine neurotransmitter plasticity in the adult substantia nigra [online]. *Journal of chemical neuroanatomy*, 2016, **73**, 21-32. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.jchemneu.2015.12.009
 136. SATTLER, R. und M. TYMIANSKI. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 2000, **78**(1), 3-13.
 137. ARUNDINE, M. und M. TYMIANSKI. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell calcium*, 2003, **34**(4-5), 325-337.
 138. RODRIGUEZ, M.C., J.A. OBESO und C.W. OLANOW. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease. A target for neuroprotection. *Annals of neurology*, 1998, **44**(3 Suppl 1), S175-88.
 139. WELTER, M.-L., J.-L. HOUETO, A.-M. BONNET, P.-B. BEJJANI, V. MESNAGE, D. DORMONT, S. NAVARRO, P. CORNU, Y. AGID und B. PIDOUX. Effects of high-frequency stimulation on subthalamic neuronal activity in parkinsonian patients [online]. *Archives of neurology*, 2004, **61**(1), 89-96. ISSN 0003-9942. Verfügbar unter: doi:10.1001/archneur.61.1.89
 140. MEISSNER, W., A. LEBLOIS, D. HANSEL, B. BIOULAC, C.E. GROSS, A. BENAZZOUZ und T. BORAUD. Subthalamic high frequency stimulation resets subthalamic firing and reduces abnormal oscillations [online]. *Brain : a journal of neurology*, 2005, **128**(Pt 10), 2372-2382. Verfügbar unter: doi:10.1093/brain/awh616
 142. FANG, X., K. SUGIYAMA, S. AKAMINE und H. NAMBA. Improvements in motor behavioral tests during deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in rats with different degrees of unilateral parkinsonism [online]. *Brain research*, 2006, **1120**(1), 202-210. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.brainres.2006.08.073
 143. SHI, L.-H., D.J. WOODWARD, F. LUO, K. ANSTROM, T. SCHALLERT und J.-Y. CHANG. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus reverses limb-use asymmetry in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions [online]. *Brain research*, 2004, **1013**(1), 98-106. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.brainres.2004.03.053
 144. ZAROW, C., S.A. LYNES, J.A. MORTIMER und H.C. CHUI. Neuronal Loss Is Greater in the Locus Coeruleus Than Nucleus Basalis and Substantia Nigra in Alzheimer and Parkinson Diseases [online]. *Archives of neurology*, 2003, **60**(3), 337. ISSN 0003-9942. Verfügbar unter: doi:10.1001/archneur.60.3.337
 145. PAL, G.D., B. OUYANG, G. SERRANO, H.A. SHILL, C. GOETZ, G. STEBBINS, L.V. METMAN, E. DRIVER-DUNCKLEY, S.H. MEHTA, J.N. CAVINESS, M.N. SABBAGH, C.H. ADLER

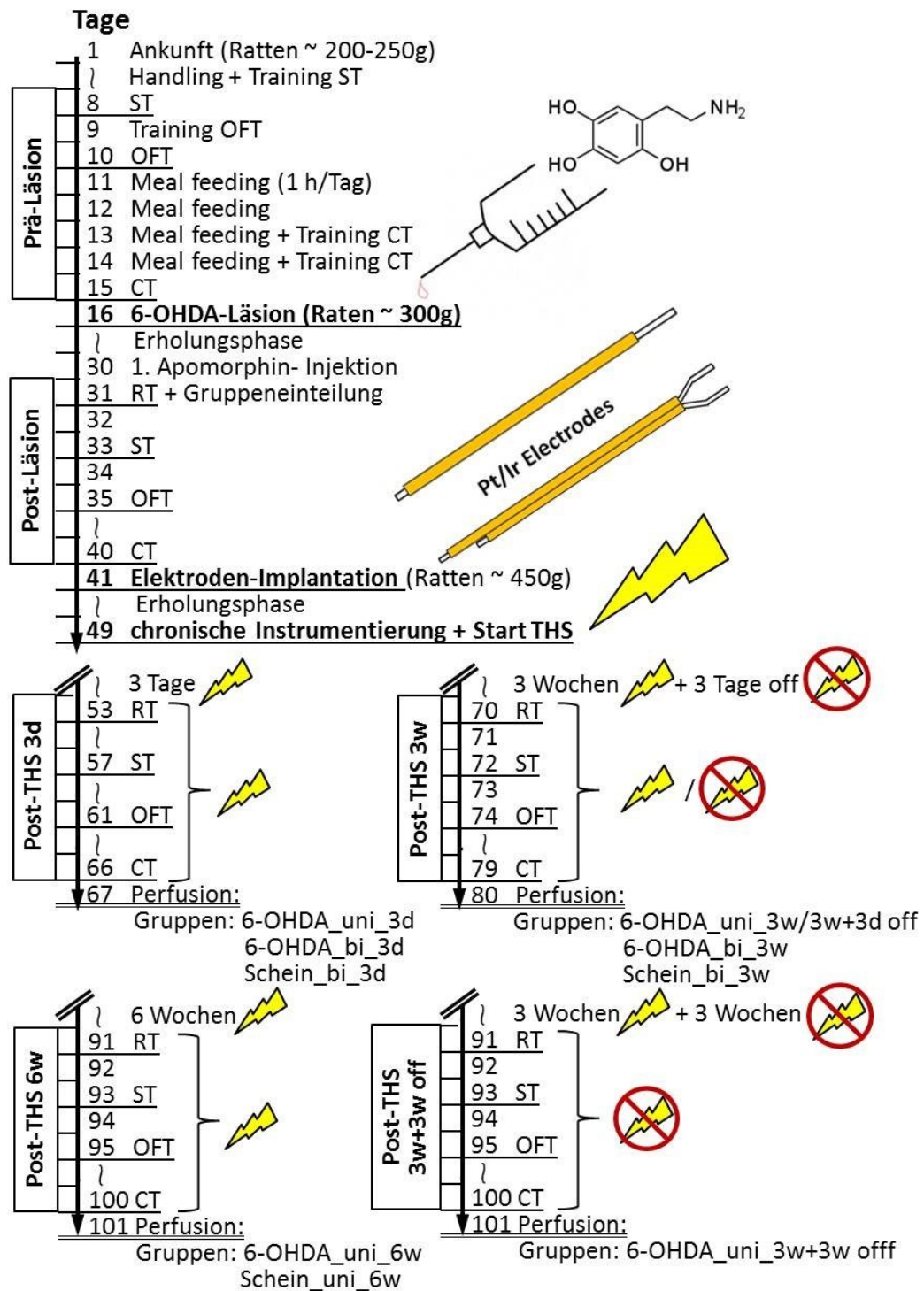
- und T.G. BEACH. Comparison of neuropathology in Parkinson's disease subjects with and without deep brain stimulation [online]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2017, **32**(2), 274-277. ISSN 1531-8257. Verfügbar unter: doi:10.1002/mds.26882
146. HAEGELEN, C., T. ROUAUD, P. DARNAULT und X. MORANDI. The subthalamic nucleus is a key-structure of limbic basal ganglia functions [online]. *Medical hypotheses*, 2009, **72**(4), 421-426. ISSN 0306-9877. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.mehy.2008.07.065.
 147. SCHROEDER, U., A. KUEHLER, B. HASLINGER, P. ERHARD, W. FOGEL, V.M. TRONNIER, K.W. LANGE, H. BOECKER und A.O. CEBALLOS-BAUMANN. Subthalamic nucleus stimulation affects striato-anterior cingulate cortex circuit in a response conflict task: a PET study. *Brain : a journal of neurology*, 2002, **125**(Pt 9), 1995-2004.
 148. REYMANN, J.-M., F. NAUDET, M. PIHAN, S. SAÏKALI, B. LAVIOLLE und D. BENTUÉ-FERRE. Subthalamic nucleus modulates social and anxiogenic-like behaviors [online]. *Behavioural brain research*, 2013, **252**, 356-362. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.bbr.2013.05.059
 149. TYE, K.M., J.J. MIRZABEKOV, M.R. WARDEN, E.A. FERENCZI, H.-C. TSAI, J. FINKELSTEIN, S.-Y. KIM, A. ADHIKARI, K.R. THOMPSON, A.S. ANDALMAN, L.A. GUNAYDIN, I.B. WITTEN und K. DEISSEROTH. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour [online]. *Nature*, 2013, **493**(7433), 537-541. Verfügbar unter: doi:10.1038/nature11740
 150. TAN, K.R., C. YVON, M. TURIAULT, J.J. MIRZABEKOV, J. DOEHNER, G. LABOUÈBE, K. DEISSEROTH, K.M. TYE und C. LÜSCHER. GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion [online]. *Neuron*, 2012, **73**(6), 1173-1183. ISSN 1097-4199. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.neuron.2012.02.015
 151. COHEN, J.Y., S. HAESLER, L. VONG, B.B. LOWELL und N. UCHIDA. Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area [online]. *Nature*, 2012, **482**(7383), 85-88. Verfügbar unter: doi:10.1038/nature10754
 152. BROMBERG-MARTIN, E.S., M. MATSUMOTO und O. HIKOSAKA. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting [online]. *Neuron*, 2010, **68**(5), 815-834. ISSN 1097-4199. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.neuron.2010.11.022
 153. GEISLER, S., C. DERST, R.W. VEH und D.S. ZAHM. Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat [online]. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2007, **27**(21), 5730-5743. ISSN 1529-2401. Verfügbar unter: doi:10.1523/JNEUROSCI.0012-07.2007

154. MATSUMOTO, M. und O. HIKOSAKA. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals [online]. *Nature*, 2009, **459**(7248), 837-841. Verfügbar unter: doi:10.1038/nature08028
155. SUDHYADHOM, A., F.J. BOVA, K.D. FOOTE, C.A. ROSADO, L. KIRSCH-DARROW und M.S. OKUN. Limbic, associative, and motor territories within the targets for deep brain stimulation: potential clinical implications. *Current neurology and neuroscience reports*, 2007, **7**(4), 278-289.
156. DILEONE, R.J., D. GEORGESCU und E.J. NESTLER. Lateral hypothalamic neuropeptides in reward and drug addiction. *Life sciences*, 2003, **73**(6), 759-768.
157. EISENSTEIN, S.A., J.M. KOLLER, K.D. BLACK, M.C. CAMPBELL, H.M. LUGAR, M. USHE, S.D. TABBAL, M. KARIMI, T. HERSHEY, J.S. PERLMUTTER und K.J. BLACK. Functional anatomy of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson disease [online]. *Annals of neurology*, 2014, **76**(2), 279-295. ISSN 0364-5134. Verfügbar unter: doi:10.1002/ana.24204
158. OKUN, M.S., H.H. FERNANDEZ, S.S. WU, L. KIRSCH-DARROW, D. BOWERS, F. BOVA, M. SUELTER, C.E. JACOBSON, X. WANG, C.W. GORDON, P. ZEILMAN, J. ROMRELL, P. MARTIN, H. WARD, R.L. RODRIGUEZ und K.D. FOOTE. Cognition and mood in Parkinson's disease in subthalamic nucleus versus globus pallidus interna deep brain stimulation: the COMPARE trial [online]. *Annals of neurology*, 2009, **65**(5), 586-595. ISSN 0364-5134. Verfügbar unter: doi:10.1002/ana.21596
159. DRAPIER, D., S. DRAPIER, P. SAULEAU, C. HAEGELEN, S. RAOUL, I. BISEUL, J. PERON, F. LALLEMENT, I. RIVIER, J.M. REYMANN, G. EDAN, M. VERIN und B. MILLET. Does subthalamic nucleus stimulation induce apathy in Parkinson's disease? [online]. *Journal of neurology*, 2006, **253**(8), 1083-1091. ISSN 0340-5354. Verfügbar unter: doi:10.1007/s00415-006-0177-0
160. OKUN, M., J. GREEN, R. SABEN, R. GROSS, K. FOOTE und J. VITEK. Mood changes with deep brain stimulation of STN and GPi: results of a pilot study [online]. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2003, **74**(11), 1584-1586. Verfügbar unter: doi:10.1136/jnnp.74.11.1584

Anhang A: Materialien

Verbrauchsmaterial/Gerät	Hersteller
Desktop-PC (16GB RAM, Intel Duocore)	Hewlett-Packard, Böblingen, D
Hamilton Mikroliterspritze (5 µl)	Postnova Analytics, Landsberg/Lech, D
Mikroskop VHX-5000, KEYENCE	KEYENCE Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, D
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Monoclonal anti-tyrosine hydroxylase clone TH-2	Sigma-Aldrich, Inc. , USA
Biotinylierter horse anti-mouse-IgG-AK Vectastain Elite	Vector Laboratories, Burlingame, USA
BSA biotinfrei 3%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
DAB (3,3'-diaminobenzidin) Peroxidase Substrat Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Ethylenglykol >99%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Glycerin >98%, Ph.Eur., wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Normal Horse Serum (NHS)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Phosphate-Buffered Saline (PBS) 7.4 (10X) liquid	Life Technologies Europe BV, NL
Triton X 100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Wasserstoffperoxid 35%	Merk, Darmstadt, D
Leica CV Mount	Leica Biosystems, Wetzlar, D
Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Kit)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Schüttler	Leica Biosystems, Wetzlar, D
15mm Sieb	Costar 3477, Netwell Permeable Supports
Magnetrührer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Aquarellmalpinsel Rotmarderhaar, 9951	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Stereo-Investigator Software v8.0	MicroBrightField Bioscience, USA
Lichtmikroskop BX51	Olympus, Tokyo, Japan
Digitalkamera CX9000	MicroBrightField Bioscience, USA

Anhang B: Versuchsablauf



RT = Rotationstest, ST = Stepping-Test, OFT = Open-Field-Test, CT = Korridor-Test

Anhang C: Protokoll Anfertigung von Kryostatschnitten²

Gehirne fixieren und entwässern

- nach Abschluss der Versuche wurden die Ratten mit Paraformaldehyd perfundiert und die Gehirne entnommen
- Falcons mit Paraformaldehyd füllen und beschriften
- Gehirne in die Falcons überführen und bei 4°C über Nacht, max. 2 Tage fixieren (ansonsten Gefahr der Überfixierung, schlecht für AK- Bindung)
- danach Gehirne in 20% Sucrose (Haushaltszucker) in PBS überführen über Nacht bei 4°C bis Hirne abgesunken sind Gehirne tieffrieren
- Kryostat 30 min vor Beginn der Arbeit auf -30°C stellen
- kleine quadratische Alufolien vorbereiten und in den Kryostaten legen, kleine Papierschnipsel mit entsprechenden Tiernummern beschriftet (Bleistift) ebenso
- Isopentan (bei -80°C in mehreren kleinen Flaschen zu 250 ml lagern) in einen Plastikbecher füllen, der in einem Styroporzylinder steht und in den Kryostaten stellen
- Temperatur messen: Soll: ca. -50°C bis -60°C
- die Sucrose aus dem Falcon mit dem Gehirn vorsichtig über dem Ausguss ausschütten - Falcon in den Kryostaten legen
- Hirn vorsichtig mit Pinzette herausnehmen und auf ein Küchentuch abtupfen
- Gehirne für 5 min in -50°C bis -60°C kaltes Isopentan geben
- danach vorsichtig auf Küchentuch legen (um letzte Feuchtigkeit aufzusaugen)
- Gehirne auf die zugeschnittene Alufolie legen und zusammen mit einem Papierzettel mit der Tiernummer einwickeln
- in beschrifteten Pappkartons (mit Gruppenbezeichnung) bei -80°C lagern

² Protokoll erstellt von Kathrin Badstübner-Meeske, Forschungslabor für experimentelle Neurologie, Klinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock

- Isopentan zurückschütten (kann wiederverwendet werden) Kryoschnitte anfertigen
- Kryoprotektionslösung ansetzen: o 30% Ethylenglykol o 25% Glycerin o in PBS gelöst

1 l: 300 ml Ethylenglykol + 250 ml Glycerin auf 1 l auffüllen mit PBS

- die Gehirne sollten ca. 30 min ruhen bevor sie geschnitten werden (in der Zeit alles vorbereiten)
- Tissue Tek auf den Pilz geben (RT) und einen Zylinder gerade daraufsetzen (wichtig für *flat skull* Position des Gehirnes) und im Kryostaten anfrieren
- ein Tropfen Tissue Tek innen an den Rand des Zylinders geben
- das Gehirn mit einer Pipette greifen und mit der langen Stirnseite an den inneren Rand des Zylinders möglichst gerade aufsetzen (optische Kontrolle, notfalls nachjustieren) und anfrieren lassen
- wenn komplett angefroren, dann vorsichtig den Zylinder durch leichtes Drehen entfernen
- das Gehirn mit Tissue TEK nochmals „Ummanteln“ und anfrieren
- Pilz einspannen und ausjustieren, dass der Anschnitt genau gerade erfolgt
- an der rechten Seite mit einer Klinge den Cortex anschneiden, um später die Ausrichtung der Schnitte zu ermitteln
- später wenn der äußere Bereich sich vom Schnitt löst (im Bereich Sth/SN), mit einer Kanüle mittig im Gehirn rechts einstechen
- Klinge Einsetzen
- Schnittdicke 30µm einstellen
- Kammertemperatur 21°C, OT 17-18°C , Winkel 0-3°C
- solange anschneiden bis man sich im gewünschten Bereich befindet
- die Schnitte mit einem Pinsel, den man immer mit PBS spült, in Wells mit Kryoprotektionslösung überführen
- dabei das Schneideschema einhalten
- Die Schnitte in den Wells mit Kryoprotektionslösung können in Alufolie umwickelt bei -20° über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

Anhang D: Protokoll TH-Färbung³

Immunhistochemische Färbung (ABC Methode) von Tyrosinhydroxylase mittels DAB-Visualisierung und Nickelionenverstärkung von 30 µm dicken Kryoschnitten des Rattenhirns (Färbung der Bereiche SN und PTg).

Die Schnitte liegen in Kryoprotektionslösung (30% Ethylenglycol und 25% Glycerol in Phosphatgepufferter Saline (PBS)) bei -20°C vor. Die Färbung erfolgt im „Free floating“-Verfahren in 12 Well Zellkulturschalen, wobei sich in jedem Well 3 Schnitte von 30 µm Dicke befinden.

Tag 1 (TH-Färbung)

- 1.) Schnitte mittels Pinsel aus der Kryolösung in beschriftete Wells mit PBS geben

- 2.) Schnitte waschen

2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

- 3.) Endogene Peroxidase blocken

15 min in 3% H₂O₂ (in PBS) bei RT schütteln (90 rpm)

Stammlösung 35% H₂O₂ Verdünnung 1:11,7

2 ml pro Well x ____ Wells = ____ ml Endvolumen werden benötigt

1:11,7 ml

x: ____ ml Endvolumen x = ____ ml 35% H₂O₂

____ ml PBS + ____ ml 35% H₂O₂ = ____ ml Endvolumen

- 4.) Waschen (1) Entfernen des überschüssigen H₂O₂

2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

³ Protokoll erstellt von Franziska Alfen (MTA), Forschungslabor für experimentelle Neurologie, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock

5.) Blocken von unspezifischen Bindungsstellen

1 h in 3% BSA biotinfrei + 1:67 normales Pferdeserum (normal horse serum, NHS) in 0,05% Triton X 100 in PBS bei RT schütteln (70 rpm)

0,6 ml pro Well x ____ = ____ ml Endvolumen werden benötigt

3% BSA in 0,05% Triton X 100 in PBS

3% = 3 g : 100 ml

x : ____ ml Endvolumen x = ____ g BSA

____ g BSA einwiegen und in ____ ml 0,05% Triton X 100 in

PBS lösen, auf dem Magnetrührer erhitzen und rühren las-

sen

NHS

1:67

x : ____ ml Endvolumen x = ____ ml 100% NHS

____ ml 3% BSA in 0,05% Triton X 100 in PBS + ____ ml 100% NHS

= ____ ml Endvolumen

6.) Erste Antikörperinkubation

Primär-AK: Maus (mouse) Anti-TH über Nacht bei 4°C schütteln (70 rpm)

Stammlösung 7 Verdünnung 1:1000 in 1% BSA 0,025% Triton X 100 in PBS

0,6 ml pro Well x ____ Wells = ____ ml Endvolumen werden benötigt

Ein Well mit PBS füllen als Negativkontrolle. 1% BSA in 0,025% TX in

doppelter Menge ansetzen, da es auch für die Zweitantikörperinku-

bation benötigt wird.

BSA

1% = 1 g : 100 ml

x : ____ ml Endvolumen x = ____ g BSA

→ **2 x ____ g BSA einwiegen und in 2 x ____ ml 0,025% Triton X**
lösen,

rührend auf Magnetrührer erhitzen, vor Benutzung auf RT abkühlen lassen

Antikörper

1:1000

x: ____ ml Endvolumen x = ____ ml = ____ µl Mouse-Anti-TH-AK

→ ____ ml 1% BSA in 0,025% Triton X 100 + ____ ml Mouse-Anti-TH-A
= ____ ml Endvolumen

Tag 2 (TH-Färbung)

7.) Waschen: **2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)**

8.) Zweite Antikörperinkubation

**Sekundär-AK biotinyliert: Pferd (horse) Anti-Mouse-IgG (Vectastain Elite)
über Nacht bei 4°C schütteln (70 rpm, oder 2h bei RT)**

Stammlösung □ Verdünnung 1:200 in 1% BSA 0,025% Triton X 100 in PBS
0,6 ml pro Well x ____ Wells = ____ ml Endvolumen werden benötigt

Antikörper

1:200 ml

x: ____ ml x = ____ ml = ____ µl Horse-Anti-Mouse-IgG-AK

____ ml 1% BSA in 0,025% Triton X 100 + ____ ml Horse-Anti-Mouse-IgG-AK = ____ ml Endvolumen

Tag 3 (TH-Färbung)

9.) Vorbereitung der ABC-Lösung

Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC-Kit, Vectastain Elite) vorbereiten durch 30 min Vorinkubation bei RT auf Magnetrührer

0,6 ml pro Well x ____ Wells = ____ ml Endvolumen werden benötigt

Solution A 1:50 + Solution B 1:50 in PBS

1: 50 ml

x: ____ ml x = ____ ml = ____ µl Solution A bzw. B

____ ml PBS + ____ µl Solution A + ____ µl Solution B = ____ ml
Endvolumen

10.) Waschen: **2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)**

11.) ABC-Inkubation

1 h in ABC-Lösung bei RT schütteln (70 rpm)

0,6 ml der vorbereiteten Lösung werden in Wells eingefüllt und die Schnitte überführt

12.) Waschen

2 x 10 min in 2 ml PBS pro Well bei RT schütteln (90 rpm)

13.) Vorbereitung **DAB-Lösung** aus KIT

- | | | |
|----|-------------------------------|--------------------|
| 1. | H2O dest | 20ml |
| | +Buffer stock | 8 Tropfen Mischen |
| 2. | +DAB stock | 16 Tropfen Mischen |
| 3. | +Hydrogen Peroxidase Solution | 8 Tropfen Mischen |
| 4. | +Nickel Solution | 8 Tropfen Mischen |

Lösung in Wells geben, Schnitte hinzu; Färbung sehr stark: **2-5 min** reichen.

15.) Färbereaktion abstoppen durch Überführen der Schnitte in eine neue Platte mit PBS und 10 min in 2 ml PBS bei RT schütteln (90 rpm)

16.) nochmaliges **Waschen in 2 ml PBS**, da Schnitte noch nachfärben
Schnitte können bei 4°C und 70 rpm mehrere Tage gelagert werden

17.) Aufziehen der gefärbten Schnitte auf OT

Schnitte in Schale mit 1 x PBS 1:10 verdünnt geben und mit Pinsel auf OT platzieren (3 Schnitte pro OT in richtiger Reihenfolge: siehe Paxinos und Watson [2007])

18.) Trocknen

30 min OT bei RT lufttrocknen

19.) Eindecken vorbereiten

2 x 5 min in Xylen (Dimethylbenzen) gut spülen

20.) Eindecken

mit Deckgläschen in Leica Mount eindecken

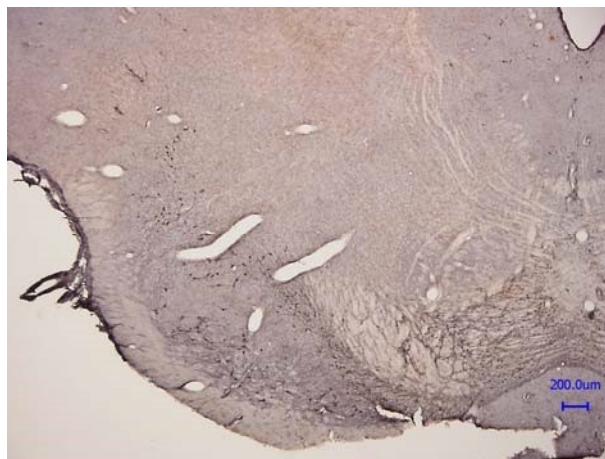


Abb. 47: Beispiel für TH-Färbung

Lebenslauf

Manuel Ricken

Gaffelschonerweg 1b • 18055 Rostock

m.ricken@t-online.de

Tel: 0163/6309865

Persönliche Daten

.....
Name: Manuel Alexander Ricken
Geboren am: 24.06.1991
Geburtsort: Karlsruhe

Ausbildung

.....
1997 – 2001: Alfred-Delp-Grundschule, Ludwigshafen am Rhein
2001 – 2010: Theodor-Heuss-Gymnasium, Ludwigshafen am Rhein
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,9)
05/2010 – 10/2010: Ausbildung zum Rettungssanitäter Deutsches Rotes Kreuz
Ludwigshafen am Rhein
11/2010 – 09/2012: Ausbildung zum Rettungsassistenten bei NAW Berlin und
Deutschem Roten Kreuz Ludwigshafen mit Praktika am Uni-
versitätsklinikum Mannheim sowie Vivantes Klinikum Fried-
richshain (Berlin)
10/2012 – 12/2018: Studium Humanmedizin in Rostock
Abschluss: Staatsexamen (Gesamtnote 1,0)
Ab 12/2018: Assistenzarzt für Innere Medizin, Abteilung für Gastroentero-
logie, Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten,
Universitätsmedizin Rostock

Stipendien

.....
Studienstiftung des Deutschen Volkes – Aufnahme 03/15

Fortbildungen

.....
ALS (Advanced Life Support) – Provider 2012, Landau (Vorschlag zum Instructor)
PHTLS (Prehospital Trauma Life Support) – Provider 2012, Landau
EPLS (European Pediatric Life Support) – Provider 2012, Landau

Mitgliedschaften

.....
Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM)

Sprachen

.....
Englisch Kompetente Sprachverwendung (C1 – Niveau)
Spanisch Selbstständige Sprachverwendung (B1 – Niveau)
Französisch Elementare Sprachverwendung (A2 – Niveau)
Latein Latinum

Rostock, 05.09.2019

Manuel Ricken